

Funktionelle Analyse von Fussel während der Entwicklung des
Nervensystems in *Drosophila melanogaster*



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG
DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von Mathias Raß
aus Schwandorf
im Jahr 2016

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am **29.04.2016**.

Die Arbeit wurde angeleitet von: **Prof. Dr. Stephan Schneuwly**

Mathias Raß

“Curiosity is not a sin... But we should exercise caution with our curiosity... yes, indeed.”

Albus Dumbledore

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 BMP/TGF- β -Signalweg in <i>Drosophila melanogaster</i>	3
1.2 Die Ski/Sno-Proteinfamilie	4
1.3 Fussel-Proteine im humanen und murinen System.....	6
1.4 Fussel in <i>Drosophila melanogaster</i>	7
1.5 Die circadiane Uhr und die Siesta	10
1.6 Gustatorische Rezeptorneurone in <i>Drosophila melanogaster</i>	13
1.7 Aufbau des Komplexauges.....	15
1.8 Entwicklung des Auges	17
1.8.1 Antagonistische Wirkung des Dpp- und Wg-Signalwegs bei der Augenentwicklung.....	17
1.8.2 Einfluss des Dpp-Signalwegs auf das Retinal Determination Gene Network.....	18
1.8.3 Inhibierung des Zellzyklus durch den Dpp-Signalweg	19
1.9 Das MiMIC-Transposon-System	19
1.10 Zielsetzung der Arbeit.....	21
2 ERGEBNISSE.....	22
2.1 Expression von Fussel für die Herstellung von polyklonalen anti-Fuss-Antikörper	22
2.1.1 Expression der <i>fussB</i> -Spleißform in <i>E. coli</i>	22
2.1.2 Optimierung der Codonsequenz von <i>fussB</i> für die Expression in <i>E. coli</i>	23
2.1.3 Expression der optimierten Codonsequenz von <i>fussB</i> in <i>E. coli</i>	23
2.1.4 Aufreinigung von FussB-opt-GST	23
2.1.5 Design eines löslichen Fragments von Fuss	24
2.1.6 Expression eines löslichen Fragments von Fuss in <i>E. coli</i>	25
2.1.7 Aufreinigung von Fussfrag-opt-His.....	26
2.1.8 Analyse unterschiedlicher Expressionsbedingungen von Fussfrag-opt-His.....	26
2.1.9 Expression und Aufreinigung von Fussfrag-opt-His im großen Maßstab zur Antikörperherstellung	27

2.2	Überprüfen der polyklonalen Antikörperseren.....	28
2.2.1	Detektion von Fussfrag-opt-His mittels Immunoblotting durch die erzeugten Antikörper	28
2.2.2	Detektion eines Fussel-GFP-Fusionsproteins mittels Immunoblotting durch die erzeugten Antikörper.....	28
2.2.3	Detektion von Fuss in Embryonen und im larvalen Gehirn	29
2.3	Analyse der Fuss-Mutante Mi13731 und Erzeugung einer <i>fuss</i>-Gal4-Linie durch RMCE	31
2.3.1	Das ZNS homozygoter Mi13731-Larven weist weniger GFP-exprimierende Zellen auf.....	32
2.3.2	Mi13731 führt zu einer starken Herunterregulierung von <i>fussB</i> und <i>fussD</i>	33
2.3.3	In Gehirnen von homozygoten Mi13731-Larven kann keine Fussel-Expression detektiert werden.....	33
2.3.4	Erzeugung einer <i>fuss</i> -Gal4-Linie durch RMCE in der MiMIC-Linie Mi13731.....	34
2.4	Expressionsanalyse von Fussel	36
2.4.1	Fussel ist in postmitotischen Neuronen exprimiert	36
2.4.2	Fussel ist in unterschiedlichen Interneuronentypen exprimiert.....	38
2.4.3	Fuss-Neurone schütten unterschiedliche Neurotransmitter aus.....	40
2.4.4	Fuss ist außerhalb des ZNS auch in sensorischen Neuronen exprimiert.....	42
2.5	Funktionsanalyse von Fussel	43
2.5.1	Verlust der GFP-Expression in der homozygoten Mi13731-Linie ist nicht die Folge von Zelltod.....	44
2.5.2	Fussel wird nicht für die korrekte Differenzierung des Pilzkörpers benötigt.....	45
2.5.3	Fussel ist endogen nicht am Dpp-Signalweg beteiligt.....	48
2.5.4	Fussel ist kein Regulator von Sparkling	50
2.6	Verhaltensanalyse adulter Fuss-Mutanten	52
2.6.1	Fussel ist nicht in den adulten Uhrneuronen exprimiert.....	52
2.6.2	Fuss-mutante Fliegen halten länger Siesta	54
2.6.3	Homozygote Mi13731-Männchen weisen eine altersabhängige Verringerung der Klettergeschwindigkeit auf.....	57
2.6.4	Mi13731-Fliegen haben eine verringerte Koffeinrezeption	58
2.7	Analyse des onkogenen Potentials von Fuss.....	60
2.7.1	Nur klonale Expression von Fuss in Augenscheiben führt zu Auswüchsen	60
2.7.2	Fuss-Klone exprimieren keine retinalen Differenzierungsmarker	61
2.7.3	Fuss-Klone und umliegende Zellen weisen erhöhte Proliferation auf.....	63
2.7.4	Fuss-Klone exprimieren das Morphogen Wingless.....	64
3	DISKUSSION	66

3.1	Die Antikörper gegen Fuss und die Mi13731-Linie sind für die Analyse der Fuss-Expression und Funktion bestens geeignet	66
3.2	Ein Teil der Fuss-Neurone stammt wohl von den Neuroblasten 5-6T, NB4-1 und NB4-2 ab.	68
3.3	Fuss wird postmitotisch in Neuronen exprimiert, die GABA, ACh oder Glutamat ausschütten	69
3.4	Handelt es sich bei den Phänotypen von <i>Df(4)dCORL</i> um <i>loss of function</i> -Phänotypen von <i>toy</i> ?	70
3.5	Fuss ist kein Inhibitor des Dpp-Signalwegs	72
3.6	Fuss reguliert teilweise seine eigene Expression	74
3.7	Mi13731-Fliegen weisen adult vielfältige Phänotypen auf.....	74
3.8	Fuss macht Zellen unempfindlich für das Dpp-Morphogen	77
4	MATERIAL	80
4.1	Fliegenstämme	80
4.2	Bakterienstämme.....	82
4.3	Medien	83
4.4	Vektoren	83
4.5	Oligonukleotide.....	84
4.6	Lösungen	85
4.7	Antikörper	87
4.8	Enzyme und Kits.....	89
4.9	Geräte	90
4.10	Software.....	90
4.11	Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Enzyme	91
5	METHODEN.....	92

5.1	Molekularbiologische Methoden - Proteine	92
5.1.1	Vorversuche zur Überprüfung der Expressionsstärke der getaggtten Proteine in <i>E. coli</i> -Zellen	92
5.1.2	Expression der GST- oder His-getaggtten Fussel Proteine für die Aufreinigung im kleinen Maßstab.....	92
5.1.3	Aufreinigung von GST-getaggtten Fussel-Proteinen im kleinen Maßstab.....	92
5.1.4	Aufreinigung von His-getaggtten Fussel-Proteinen im kleinen Maßstab.....	93
5.1.5	Proteinexpression des Fuss-Fragments für die Antikörperherstellung.....	93
5.1.6	Aufreinigung des Fuss-Fragments aus <i>E. coli</i> -Zellen.....	94
5.1.7	Dialyse von Proteinlösungen	94
5.1.8	Herstellung der polyklonalen Antisera	94
5.1.9	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	95
5.1.10	Proteinextraktion aus Larven	95
5.1.11	Immunoblot.....	95
5.1.12	Coomassie-Färbung	96
5.2	Molekularbiologische Methoden - Nukleinsäuren	96
5.2.1	Semi-quantitative real-time PCR.....	96
5.2.2	Polymerasekettenreaktion.....	97
5.2.3	Sequenzierung.....	98
5.2.4	Agarose-Gelelektrophorese	98
5.2.5	Heat-Shock Transformation von <i>E. coli</i>	98
5.2.6	Analytischer DNA-Verdau	98
5.2.7	Präparativer DNA-Verdau	99
5.2.8	Gelextraktion	99
5.2.9	Konzentrationsbestimmung	99
5.2.10	Ligation.....	99
5.2.11	RNA-Extraktion aus adulten Fliegen.....	99
5.2.12	Gewinnung von Plasmid-DNA	99
5.2.13	Reverse Transkription.....	100
5.2.14	BP-Gateway-Reaktion	100
5.2.15	LR-Gateway-Reaktion	100
5.2.16	Codonoptimierung von <i>fussel</i> für die Expression in <i>E. coli</i>	100
5.2.17	Absammeln von adulten Köpfen für RNA-Extraktion	100
5.3	Histologische Methoden	101
5.3.1	Absammeln von Embryonen für immunfluoreszente Antikörperfärbung.....	101
5.3.2	Anfertigung von Ganzpräparaten	101
5.3.3	Präparation adulter Gehirne.....	101
5.3.4	Präabsorption der anti-Fuss polyklonalen Antikörper.....	102
5.3.5	Immunfluoreszenzfärbung	102

5.3.6	BrdU-Proliferationsanalyse	102
5.3.7	Erzeugung von Fussel-überexprimierenden Klonen	103
5.3.8	Entraining der Fliegen für die anti-Vrille-Färbung	103
5.4	Keimbahntransformation und genetische Methoden.....	103
5.4.1	Mikroinjektion	103
5.4.2	Selektion der Transformanten und Erzeugung stabiler Linien	104
5.4.3	Gewebespezifische Überexpression von Genen und gewebespezifische RNA-Interferenz..	104
5.5	Verhaltensanalysen.....	104
5.5.1	<i>Two choice feeding assay</i>	104
5.5.2	Negative Geotaxis.....	105
5.5.3	Bestimmung der Lebensdauer	105
5.5.4	Lokomotor-Aktivitäts-Analyse.....	105
6	ANHANG.....	107
6.1	Literaturverzeichnis.....	107
6.2	Analyse der Siesta nach Knockdown von Fuss in unterschiedlichen Neuronen	116
6.3	Vergleich von Fuss und Gsb im VNS.....	117
6.4	Vergleich von Fuss und Engrailed im VNS.....	117
6.5	Bindestellen von Fuss am <i>spa</i>-Genlokus.....	117
6.6	Sequenz von Fussfrag-opt-His.....	118
6.7	Abbildungsverzeichnis	118
6.8	Tabellenverzeichnis	121
6.9	Abkürzungsverzeichnis.....	121

Zusammenfassung

Das *functional Smad suppressing element (fussel)* in *Drosophila melanogaster* gehört zur Ski/Sno-Proteinfamilie, die sich durch eine Ski/Sno-Homologiedomäne und eine Smad4-Bindedomäne auszeichnet. Eine wichtige Funktion dieser Proteine im physiologischen Kontext ist dabei die Inhibierung des TGF- β -Signalwegs, der in einem breiten Bereich von Entwicklungsprozessen benötigt wird. In vielen unterschiedlichen Tumoren wie Magen- oder Speiseröhrentumore konnte eine Hochregulierung von Ski und Sno entdeckt werden, was auf eine wichtige Rolle dieser als Protoonkogene bezeichneten Proteine deutet. In *Drosophila melanogaster* konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Fuss den Dpp-Signalweg hemmen kann, während erst kürzlich veröffentlicht wurde, dass Fuss möglicherweise endogen an der Entwicklung der Pilzkörper und am Activin- β -Signalweg beteiligt sein könnte.

Der Fokus dieser Arbeit lag in der Entwicklung neuer Werkzeuge, die für eine umfassende Analyse der endogenen Funktion notwendig waren. Dabei gelang es durch die Expression und Aufreinigung des Fuss-Proteins mit anschließender Immunisierung ein polyklonales Serum zu erzeugen, welches eine spezifische Färbung von Fussel während der embryonalen und larvalen Entwicklung bis in das adulte Stadium aufweist. Mit Hilfe einer neuen Fuss-Mutante Mi13731 und einer daraus erzeugten, spezifischen *fuss*-Gal4-Linie konnte die Herkunft und Zellidentität der Fuss-exprimierenden Zellen und die Funktion von Fuss erstmalig in einer spezifischen Mutante untersucht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass Fuss ausschließlich postmitotisch in Neuronen exprimiert wird. Diese stammen im ventralen Strickleiternervensystem von den Neuroblasten NB5-6T, NB4-1 und NB4-2 ab und repräsentieren mehrheitlich Interneurone. Fuss ist aber auch in wenigen sensorischen Neuronen exprimiert, insbesondere in gustatorischen Rezeptorzellen. Im Gegensatz zu den bisherigen Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass Fussel endogen weder am Dpp-Signalweg noch an der Entwicklung der Pilzkörper beteiligt ist. Fuss-mutante Fliegen zeigen keine erhöhte Letalität während der Entwicklung und keine verkürzte Lebensdauer. Dafür weisen sie eine verschlechterte Koffeinrezeption auf, was vermutlich auf einen spezifischen Defekt der gustatorischen Bitterrezeptoren zurückzuführen ist. Ebenso sind die Fuss-Mutanten in ihrer Aktivität während der Siesta stark reduziert und verleben länger in der Siesta.

Die Überexpression von Fuss in Augenscheiben führt zu Auswüchsen in der Entwicklung der Augen. Diese sind auf erhöhte Proliferation der Fuss-exprimierenden Klone zurückzuführen, da diese unempfindlich für das Dpp-Signal werden. Somit kann die Wg-Expression nicht inhibiert werden, die Zellen proliferieren weiter anstatt zu differenzieren und resultieren schließlich in Auswüchsen aus der Augenscheibe. Dies ist ähnlich der Funktion von Ski und Sno in Tumoren, in welchen diese den antiproliferativen TGF- β -Signalweg inhibieren.

1 Einleitung

1.1 BMP/TGF- β -Signalweg in *Drosophila melanogaster*

Während der Entwicklung spielt die TGF- β (*transforming growth factor beta*)-Superfamilie eine wichtige Rolle bei zellulären Vorgängen wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Adhäsion, Wundheilung, Knochenmorphogenese und Zellbewegung. Der Signalweg der TGF- β -Superfamilie ist zwischen Vertebraten und Invertebraten stark konserviert (Kawabata und Miyazono, 1999; Lin *et al.*, 2006; Massague, 1998).

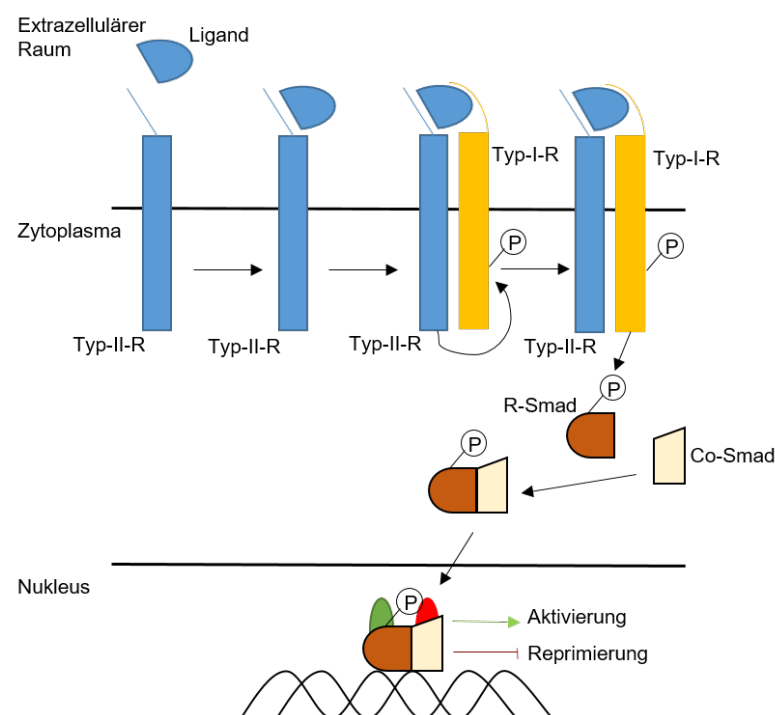


Abbildung 1: Prinzip der Signalweiterleitung des BMP- bzw. TGF- β -Signalwegs. Nach der Bindung des Liganden an den Typ-II-Rezeptor (Typ-II-R) rekrutiert und aktiviert dieser den Typ-I-Rezeptor (Typ-I-R) durch Phosphorylierung. Typ-I-R phosphoryliert das R-Smad, welches dann an das Co-Smad bindet und diese als Komplex in den Kern translozieren. Dort aktiviert oder hemmt dieser Komplex mit Hilfe von Koaktivatoren bzw. Korepressoren die Transkription der Zielgene.

In *Drosophila melanogaster* konnten sieben Liganden der TGF- β -Superfamilie identifiziert werden. Dazu zählen Decapentaplegic (Dpp), Glass Bottom Boat (Gbb), Screw (Scw), Activin- β (Act), Dawdle (Daw), Myoglianin (Myo) und Maverick (Mav). Dpp, Gbb und Scw aktivieren den Dpp/BMP-Signalweg, Act, Daw, Myo und Mav die Activin- β /TGF- β Signalkaskade. Die Signaltransduktion verläuft in beiden Signalwegen gleich, nur die Partizipanten sind unterschiedlich. So binden die Liganden des BMP-Signalwegs an den Typ-II-Rezeptor Wishful Thinking (Wit) oder Punt (Put), welche nachfolgend den Typ-I-Rezeptor Thickveins (Tkv) oder Saxophon (Sax)

phosphorylieren. Die Liganden des Activin- β -Signalwegs interagieren mit denselben Typ-II-Rezeptoren, diese phosphorylieren jedoch auf die Bindung eines Activin- β -Liganden hin den Typ-I-Rezeptor Baboon. Daraufhin phosphorylieren die Typ-I-Rezeptoren, die wie die Typ-II-Rezeptoren Rezeptor-Serin/Threoninkinasen sind, die R-Smads (*receptor regulated Smads*). Im Falle des BMP-Signalwegs wird das R-Smad Mad (Mothers against decapentaplegic) und beim Activin- β -Signalwegs Smox (Smad on X) phosphoryliert. Die R-Smads bilden dann einen Komplex mit dem co-Smad Med (*common mediator Smad*, Medea) und dieser Komplex wandert in den Nukleus, um dort zusammen mit Kofaktoren die Transkription der jeweiligen Zielgene zu aktivieren bzw. zu reprimieren (Abb. 1; Gesualdi und Haerry, 2007; Parker *et al.*, 2004).

Negative Regulatoren des BMP- bzw. Activin- β -Signalwegs, die in *Drosophila melanogaster* identifiziert werden konnten, sind das I-Smad Dad (*inhibitory Smad*, Daughters against dpp), die E3-Ubiquitin-Ligase dSmurf und die Mitglieder der Ski/Sno-Familie, Fuss (Functional smad suppressing element) und Snoo (Ski related novel oncogene). Dad inhibiert den Dpp-Signalweg indem es mit Tkv interagiert und die Phosphorylierung von Mad unterbindet. Dagegen ubiquitinyliert die E3-Ubiquitin-Ligase Smurf phosphoryliertes Mad, welches dann durch das Proteasom abgebaut wird (Fischer *et al.*, 2012; Inoue *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2003; Podos *et al.* 2001; Takaesu *et al.*, 2006; Tsuneizumi *et al.*, 1997).

1.2 Die Ski/Sno-Proteinfamilie

Die Mitglieder der Ski/Sno-Proteinfamilie zeichnen sich strukturell durch eine Ski/Sno-Homologiedomäne und durch eine Smad4-Bindedomäne aus (Abb. 2).

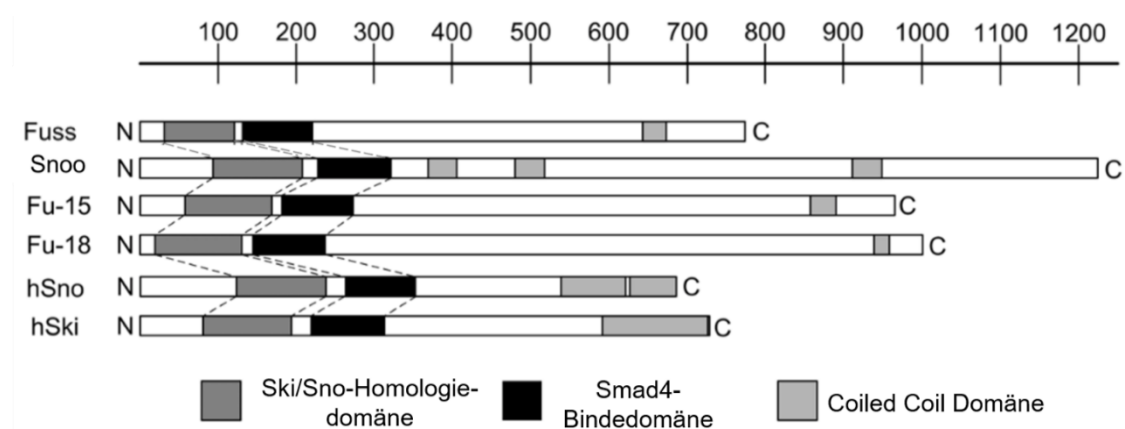


Abbildung 2: Proteine der Ski/Sno-Familie in *Drosophila melanogaster* und im humanen System. Die Ski/Sno-Proteine besitzen eine Ski/Sno-Homologiedomäne und eine Smad4-Bindedomäne am N-Terminus. Am C-Terminus liegt eine Coiled Coil Domäne. Ski/Sno-Proteine im humanen System sind Fu-

15, Fu-18, hSno und hSki. In *Drosophila melanogaster* existieren Fuss und Snoo. Fuss ist ein Homolog von Fu-15 und Fu-18, Snoo ist ein Homolog von hSno und hSki (Abb. nach Fischer *et al.*, 2012).

Die Ski/Sno-Homologiedomäne und Smad4-Bindedomäne besitzen zwar Ähnlichkeit zu DNA-bindenden Domänen, aber es konnten bisher nur Interaktionen mit anderen Proteinen nachgewiesen werden. So konnte für Ski und Sno gezeigt werden, dass N-CoR und mSin3a an die Ski/Sno-Homologiedomäne binden und darüber eine Bindung an die Histondeacetylase HDAC1 vermittelt wird. Daneben interagieren Ski und Sno mit Hilfe der Smad4-Bindedomäne mit Smad4 und binden N-terminal an die R-Smads: Smad2 und Smad3. Dadurch kann ein transkriptionsreprimierender Komplex an die Zielgene des TGF- β -Signalwegs gebracht werden und deren Expression hemmen (Abb. 3; Akiyoshi *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 2012; Nyman *et al.* 2010; Wilson *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2002).

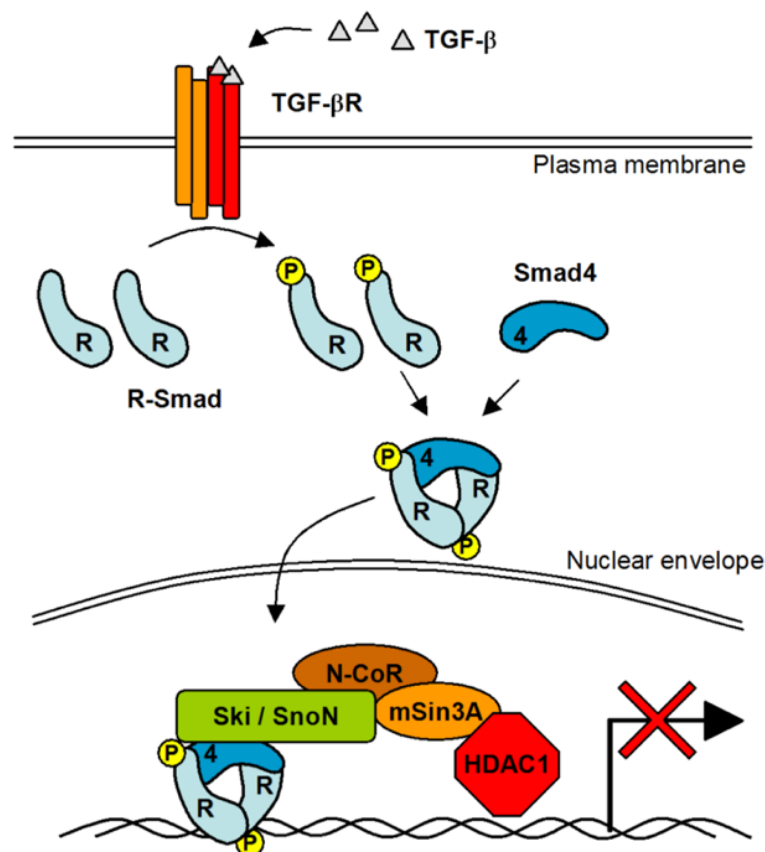


Abbildung 3: Negative Regulation des TGF- β -Signalwegs durch Ski/Sno-Proteine. Auf die Bindung von TGF- β -Liganden an die TGF- β -Rezeptoren werden die R-Smads phosphoryliert und bilden einen Komplex mit Smad4. In Gegenwart von Ski oder Sno binden diese an den R-Smad/Smad4 Komplex und rekrutieren einen Komplex aus N-CoR, mSin3a und HDAC1 an die Zielgene des TGF- β -Signalwegs, welche dadurch inhibiert werden (Abb. nach Nyman *et al.*, 2010).

Darüber hinaus werden Proteine der Ski/Sno-Familie als Protoonkogene klassifiziert, da eine Überexpression von Ski oder Sno zur Transformation von Fibroblasten von Hühnerembryonen führt (Li *et al.* 1986; Boyer *et al.*, 1993). Mittlerweile ist die

Einordnung dieser Proteine als Protoonkogene allerdings nicht mehr eindeutig. Zwar ist Ski oder Sno in Hautkrebs, Magenkrebs oder dem Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre hochreguliert, gleichzeitig konnte jedoch in mehreren Studien eine tumorsupprimierende Wirkung von Ski und Sno festgestellt werden. Ski inhibiert die Metastasierung von Lungenkrebs *in vivo* oder den Fortschritt von Brustkrebs. Heterozygote *sno*^{+/-}-Mäuse entwickeln spontan bösartige Lymphome (Edmiston *et al.*, 2005; Imoto *et al.*, 2001; Le Scolan *et al.*, 2008; Rashidian *et al.*, 2015; Reed *et al.*, 2005; Shinagawa *et al.*, 2000; Takahata *et al.*, 2009).

In *Drosophila melanogaster* wurde Snoo als Homolog des humanen Ski und Sno identifiziert. Snoo interagiert mit Medea sowie dem Smad2-Medea-Komplex und wirkt inhibierend auf den Dpp-Signalweg. Speziell im optischen Lobus fördert Snoo den Activin- β -Signalweg, indem es den Dpp-Signalweg inhibiert (Barrio *et al.*, 2007; Shrivage *et al.*, 2007; Takaesu *et al.*, 2006).

1.3 Fussel-Proteine im humanen und murinen System

Zwei weitere Gene, die im humanen System zur Ski/Sno-Familie gehören, sind *fussell15* und *fussell18* (*functional Smad suppressing element on chromosome15*, *functional Smad suppressing element on chromosome18*). Während Ski oder Sno ubiquitär exprimiert werden, ist die Expression der Fussel-Proteine auf einzelne Zellen beschränkt. So konnte Fussell15 in den Purkinjezellen des Kleinhirns und Fussell18 im adulten Rückenmark, den Hoden und in den Glomeruli der Granularzellschicht des Kleinhirns nachgewiesen werden. Außerdem wird Fussell15 in frühen Phasen der Wundheilung exprimiert. Fussell15 interagiert mit Smad1, Smad2 sowie Smad3 und es konnte eine inhibitorische Wirkung auf den BMP-Signalweg nachgewiesen werden. Fussell18 bindet an Smad2, Smad3 und Smad4 und inhibiert den TGF- β -Signalweg (Abb. 4; Arndt *et al.*, 2005; Arndt *et al.*, 2007; Arndt *et al.*, 2011).

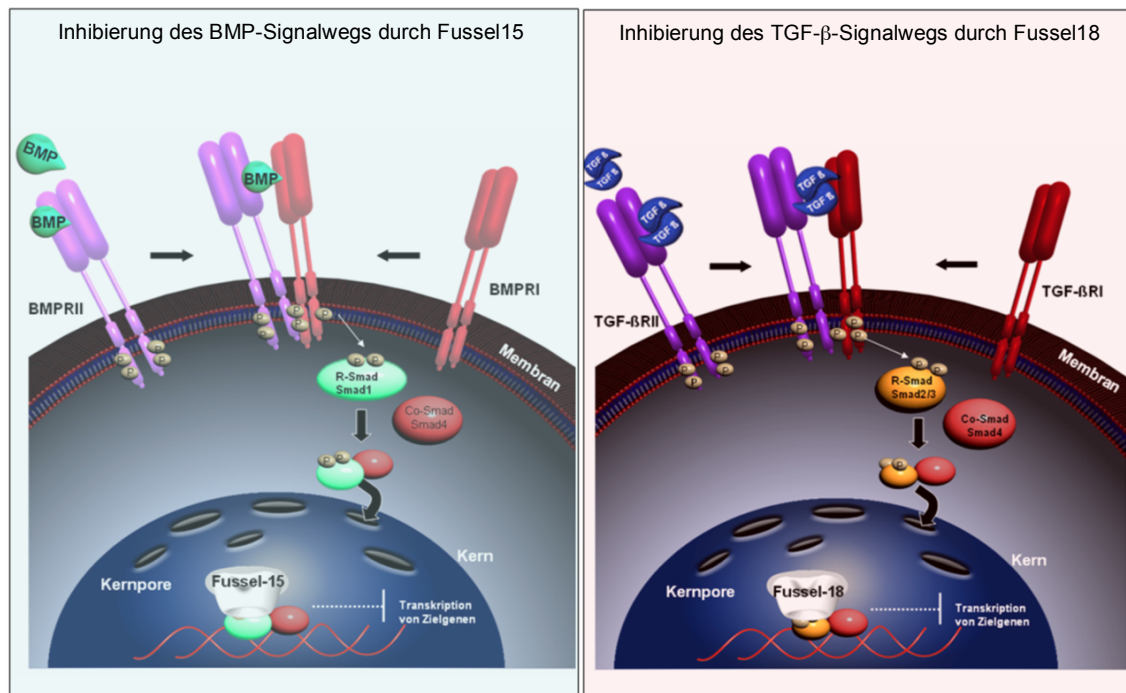


Abbildung 4: Funktionen von Fuss im BMP-Signalweg und Fussel18 im TGF- β -Signalweg. Fussel15 interagiert mit Smad1, Smad2 und Smad3 und inhibiert den BMP Signalweg, dagegen bindet Fussel18 an Smad2, Smad3 sowie Smad4 und inhibiert den TGF- β -Signalweg (Abbildung nach Arndt, 2008).

Im murinen System wurden Corl1 (Corepressor of Ladybird), das Homolog zu Fussel15, und Corl2, das Homolog zu Fussel18, identifiziert. Corl1 wird postmitotisch in Interneuronen des Rückenmarks und in GABAergen Purkinjezellen exprimiert. Corl1 interagiert mit Smad3 (Homolog zu Smad2 in *Drosophila melanogaster*) und Lbx1 (Homolog zu Ladybird early und Ladybird late in *Drosophila melanogaster*) (Mizuhara *et al.*, 2005; Nakatani *et al.*, 2014; Takaesu *et al.*, 2012). Corl2 wird ebenfalls postmitotisch u.a. adult in den GABAergen Purkinjezellen exprimiert (Minaki *et al.*, 2008). Außerdem wird es für die Expression von Sonic Hedgehog und die korrekte Differenzierung der Purkinjezellen benötigt. Im murinen System wurde gezeigt, dass Corl2 den BMP-Signalweg inhibiert (Wang *et al.*, 2011; Nakatani *et al.*, 2014).

1.4 Fussel in *Drosophila melanogaster*

In *Drosophila melanogaster* existiert nur ein Homolog zu Fussel15 (Corl1) und Fussel18 (Corl2), cg11093 bzw. Fussel (Fuss). Sequenzhomologievergleiche zeigen, dass Fuss minimal näher zu Fussel18 als zu Fussel15 verwandt ist, aber der Unterschied ist so marginal, dass keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden kann, ob die Funktion von Fuss eher der von Fussel15 oder der von Fussel18 entspricht. *fuss* ist auf dem vierten Chromosom lokalisiert und der Genlokus umfasst 16kb. Fuss besitzt drei Spleißformen: FussB, FussC und FussD. FussB und FussD unterscheiden sich nicht in der

Aminosäuresequenz, sondern nur in der 5' *untranslated region* (5'UTR). FussB und FussD besitzen 31 Aminosäuren, während FussC 25 Aminosäuren aufweist, durch welche sich diese Formen am N-Terminus unterscheiden. Diese Unterschiede der drei Formen kommen durch unterschiedliche Transkriptionsstarts zustande (Abb. 5; Fischer *et al.*, 2012; Takaesu *et al.*, 2012; *Flybase Dmel_Release_6*).

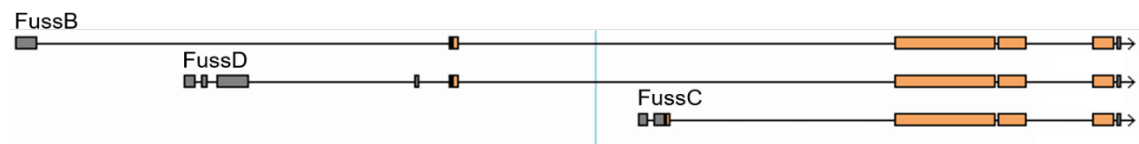


Abbildung 5: Die unterschiedlichen Spleißformen von *fuss*. FussB und FussD unterscheiden sich nicht durch die Aminosäuresequenz, sondern durch die 5' UTR. Dagegen hat FussC neben einer eigenen 5' UTR ein anderes erstes Exon als FussB und FussD. Graue Kästchen stehen für die 5' UTR bzw. 3' UTR, orange Kästchen für die translatierte Sequenz und Striche für Introns. Pfeilspitzen geben die Orientierung an (Abbildung aus *Flybase*).

Bisher gibt es zwei Studien, die die Funktion von Fuss untersucht haben, aber in einigen Punkten zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Beide Arbeiten zeigten, dass die Spleißform *fussC* durch eine Transposoninsertion entstand und wohl nur basal exprimiert wird, dagegen handelt es sich bei *fussB* um die spezifisch exprimierte Spleißform (Takaesu *et al.*, 2012; Fischer *et al.*, 2012; Raß, 2012). Für FussD konnte bisher nur gezeigt werden, dass es exprimiert wird, aber nicht, ob sich das Expressionsmuster von FussB unterscheidet (Russow, 2016). Erstmals ist die Expression von *fuss* im Embryonalstadium 12 zu beobachten. Fuss-Expression konnte in einzelnen Zellen des embryonalen Gehirns sowie des Strickleiternnervensystems und des larvalen, zentralen Nervensystems nachgewiesen werden (Takaesu *et al.*, 2012; Fischer *et al.*, 2012). Takaesu *et al.* (2012) erzeugten eine Fuss-defiziente Fliegenlinie *Df(4)dCORL*. In dieser Defizienz sind neben Fuss die zwei proteinkodierenden Gene *mGluR* sowie *4E-T* und die drei RNA-Gene *sphinx*, *cr45201* sowie *cr44030* deletiert. In der Defizienz exprimieren die Kenyonzellen während der Larvalphase kein EcRB-1 (Abb. 6A, B) und der adulte Pilzkörper weist verkürzte, deformierte oder auch fehlende dorsale Loben auf (Abb. 6D, F). Während Trio-positive Neurone nicht betroffen sind (Abb. 6C, D, blaue Pfeilspitzen), fehlen FasII-Neurone ventral des Pilzkörpers (Abb. 6C, gelbe Pfeilspitzen) und zwischen den dorsalen Loben des Pilzkörpers (Abb. 6C, weiße Pfeilspitzen). Weiter sind die beiden β -Loben zum Großteil miteinander verbunden (Abb. 6H, weißer Pfeil), diese liegen aber wildtypisch getrennt vor und Neurone der γ -Loben sind zu lang (Abb. 6E, rosa Pfeilspitzen). Durch das Fehlen eines TCHW-Motivs, wurde auch angenommen, dass Fuss nicht mit Medea interagiert, und Fuss aufgrund der Konservierung zwischen

Cor11 und Fuss dagegen mit dSmad2 interagiert. Dadurch wurde von Takaesu *et al.* die These aufgestellt, dass Fuss molekular am TGF- β /Activin- β -Signalweg beteiligt ist und während der Entwicklung für eine korrekte Ausbildung des Pilzkörpers benötigt wird. Neben diesen Phänotypen konnte bei der Defizienz eine Überlebensrate von nur 21% bis zum Adultstadium beobachtet werden. Adulte Fliegen der Linie *Df(4)dCORL* haben eine reduzierte Lebensspanne und die Weibchen eine verringerte Fertilität.

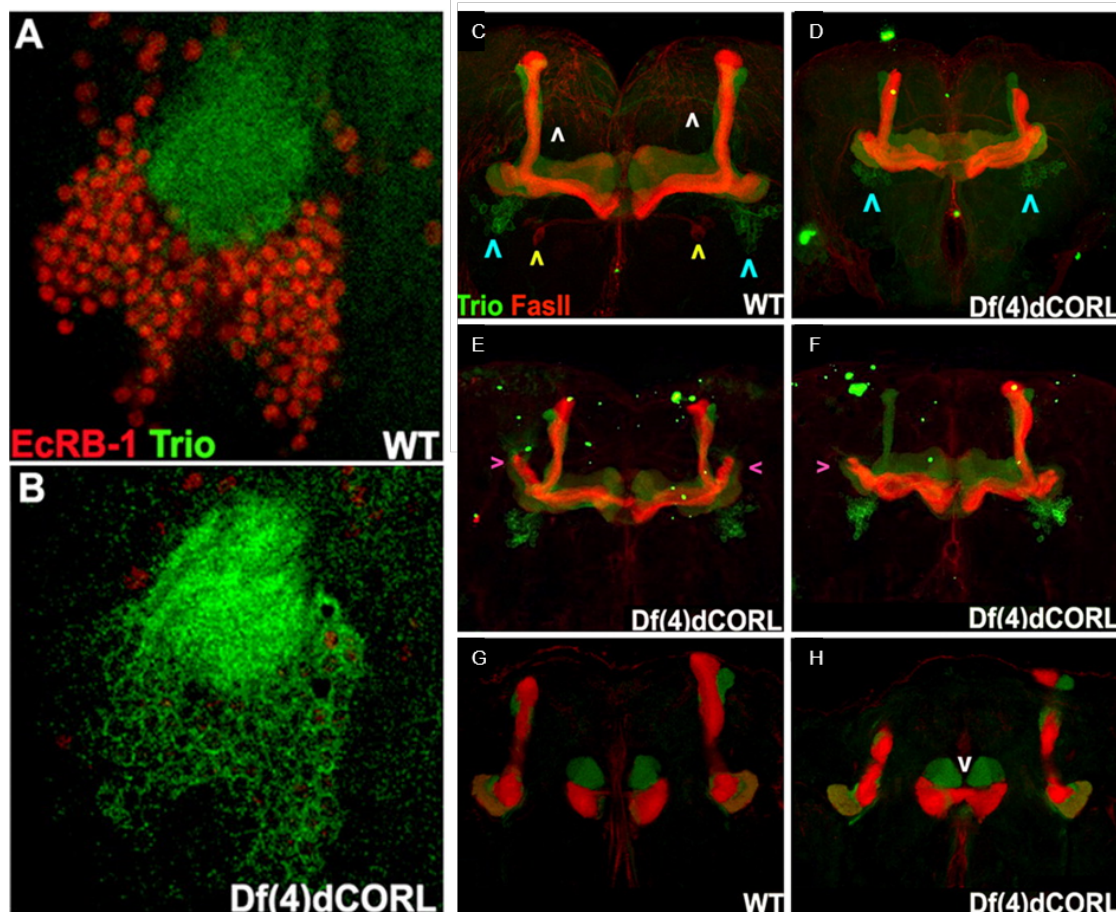


Abbildung 6: Pilzkörper von *Df(4)dCORL*-Individuen weisen larvale und adulte Defekte auf. In den mit Trio-markierten Kenyonzellen des Pilzkörpers von *Df(4)dCORL*-Larven (B) kann der Kernhormonrezeptor EcRB-1 im Vergleich zum Wildtyp (A) nicht detektiert werden. Adulte Pilzkörper von *Df(4)dCORL*-Individuen weisen vielfältige Defekte auf. Im Vergleich zum Wildtyp (C) sind die dorsalen Loben des Pilzkörpers verkürzt oder verformt (D). Weiter fehlen FasII-Neurone zwischen den dorsalen Loben (C, weiße Pfeilspitzen) und ventral zum Pilzkörper (C, gelbe Pfeilspitzen). Trio-positive Neurone ventral des Pilzkörpers sind nicht beeinträchtigt (C, D, blaue Pfeile). Die Neurone der γ -Loben sind zu lang (E, F, rosa Pfeile) und die β -Loben der beiden Hemisphären, die wildtypisch getrennt vorliegen (G), sind fusioniert (H, weißer Pfeil) (Abb. modifiziert nach Takaesu *et al.*, 2012).

Fischer *et al.* (2012) untersuchten die Funktion von Fuss dagegen mittels Überexpression im Flügel und in S2-Zellen. Dabei führt die Überexpression von Fuss im Flügel zu einer verringerten Flügelgröße, dem Verlust der Flügelvenen und der campaniformen Sensillen. Weiter konnte eine verminderte Expression von *optomotor blind* festgestellt

werden. Trotz des fehlenden TCHW-Motivs interagiert Fuss mit Medea (Homolog des humanen Smad4) in S2-Zellen. Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, dass Fuss ein negativer Regulator des Dpp-Signalwegs ist. Dagegen konnten keine inhibitorischen Auswirkungen auf den Activin- β -Signalweg gefunden werden (Fischer *et al.*, 2012).

1.5 Die circadiane Uhr und die Siesta

Viele physiologische Funktionen und Verhaltensweisen sind auf einen 24h-Rhythmus abgestimmt und für die Synchronisierung der Körperfunktionen mit der Tageszeit wird die sogenannte innere Uhr bzw. circadiane Uhr benötigt (Helfrich-Förster, 2004). Signale, sogenannte Zeitgeber, für die Synchronisation der inneren Uhr mit der Umwelt sind für den Menschen Licht und für *Drosophila melanogaster* u.a. Licht, Temperatur und Sexualinteraktionen (Hanafusa *et al.*, 2013; Tataroglu und Emery, 2014; Wright *et al.*, 2013). In *Drosophila melanogaster* ist die circadiane Uhr intensiv analysiert worden, die beteiligten Neurone sind bekannt und die molekulare Funktionsweise ist bereits gut verstanden. Aufgrund der Konservierung der „Urgene“ zwischen Mensch und Fliege stellt *Drosophila melanogaster* einen hervorragenden Modelorganismus für die Analyse der inneren Uhr dar (Panda *et al.*, 2002).

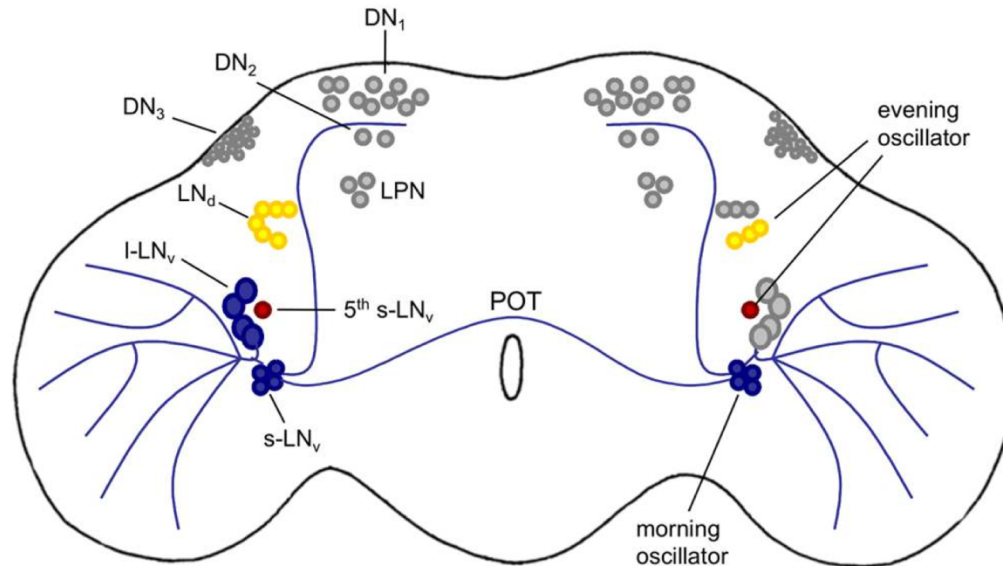


Abbildung 7: Die Uhrneurone im adulten Gehirn von *Drosophila melanogaster*. Es existieren acht Pigment-Dispersing-Factor (PDF)-exprimierende Neurone, dazu zählen vier kleine und vier große, lateroventral gelegene Neurone (blau). Zu den lateroventralen Neuronen gehört noch ein PDF-negatives s-LN_v-Neuron (rot). Darüber befinden sich die sechs laterodorsalen Neurone (gelb) und drei lateroposteriore Neurone (grau). Neben den lateralen Clustern gibt es drei dorsale Neuronen-Cluster DN₁, DN₂ und DN₃ (grau). DN₁ besteht aus ca. 15, DN₂ aus zwei und DN₃ aus ca. 40 Neuronen (Helfrich-Förster *et al.*, 2007). Drei LN_d-Neurone und das fünfte s-LN_v-Neuron sind für die Oszillation des *evening peaks* verantwortlich, während die vier PDF-positiven s-LN_v-Neurone für die Oszillation des *morning peaks* zuständig sind (Grima *et al.*, 2004; Rieger *et al.*, 2006; Abb. nach Hermann *et al.*, 2012).

Drosophila melanogaster besitzt ungefähr 150 Uhrneurone, die die Aktivität während des Tagesverlaufs regulieren. Diese Neurone werden unterteilt in die Pigment-Dispersing-Factor (PDF)-positiven, kleinen (s-LN_v) und großen lateroventralen Neurone (l-LN_v), die PDF-negative fünfte s-LN_v, die laterodorsalen Neurone (LN_d), die dorsalen Neurone (DN₁, DN₂, DN₃) und die lateroposterioren Neurone (LPN) (Abb. 7; Tataroglu und Emery, 2014).

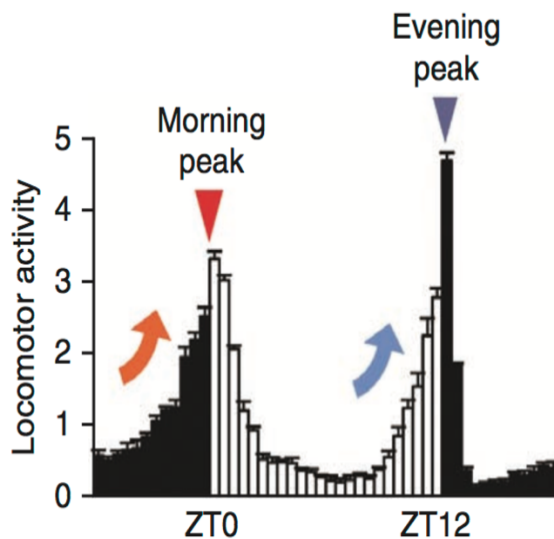


Abbildung 8: Die circadiane Lokomotoraktivität unter Laborbedingungen. Unter konstanten Temperaturen (25°C) und einem 12h-Hell/12h-Dunkel-Rhythmus (LD) ist der Zeitgeber für *Drosophila melanogaster* das Licht. Dabei ist der circadiane Lokomotoraktivitätsverlauf während des Tages unterteilt in die Schlafphase, gefolgt vom Anstieg der Aktivität bis zum Erreichen des Höhepunkts am *morning peak* kurz nach „Licht an“. Nach gesunkener Aktivität folgt die Siesta. Diese dauert an bis es zum erneuten Anstieg der Aktivität kommt, die dann ihr Maximum nach „Licht aus“ im *evening peak* erreicht und danach wieder in die Schlafphase übergeht. ZT = Zeitgeber time. (Abb. nach Lim und Allada, 2013).

Unter Laborbedingungen (konstant 25°C, 12h-Hell/12h-Dunkel-Rhythmus (LD)) ist die circadiane Lokomotoraktivität der dämmerungsaktiven *Drosophila melanogaster* unterteilt in den Aktivitätshöchststand am Morgen (*morning peak*, M), den Mittagsschlaf bzw. Siesta, den Aktivitätshöchststand am Abend (*evening peak*, E) und den Schlaf (sleep). Der *morning peak* ist kurz nach „Licht an“ (nach Zeitgeber Time ZT0) und der *evening peak* ist kurz nach „Licht aus“ (nach ZT12) (Abb. 8; Stoleru *et al.*, 2004). Die PDF-positiven s-LN_v-Neurone sind für die Oszillation der Morgenaktivität zuständig, während für die Oszillation der Abendaktivität sowohl das PDF-negative s-LN_v-Neuron als auch die LN_d-Neurone benötigt werden (Grima *et al.*, 2004; Rieger *et al.*, 2006). Die dorsalen Neurone unterstützen den *morning* und *evening peak* nur, aber können keine Oszillation aufrechterhalten (Zhang *et al.*, 2010).

Molekular wird die Oszillation der circadianen Uhr u.a. durch negative Rückkopplungsschleifen aufrechterhalten. Dabei wird die Transkription von *period* (*per*) und *timeless* (*tim*) um ZT4 durch Clock (Clk) und Cycle (Cyc) initiiert und dauert bis um ZT18 an. Eine Zunahme von Per- und Tim-Proteinen kann erst ab ZT12 beobachtet werden. Per und Tim wandern dann in den Nukleus. Dort inhibieren sie die Transkription

ihrer eigenen mRNA durch die Interaktion mit dem Clk/Cyc-Heterodimer. Dadurch nimmt die Menge an Tim und Per ab und Clk und Cyc können die Transkription von *per* und *tim* um ZT4 erneut initiieren (Blau und Young, 1999; Hardin, 2011; Lee *et al.*, 1999). Eine weitere negative Rückkopplungsschleife bildet Clk auf seine eigene Transkription. Clk und Cyc aktivieren die Transkription von *vri* (*vrille*) um ZT4, welche bis ZT16 anhält. Im Gegensatz zu *per* und *tim* wird aber *vri*-mRNA bereits kurz darauf translatiert. Vri wandert in den Nukleus und inhibiert zusammen mit PDP1 die Transkription von *clk* (Blau und Young, 1999; Cyran *et al.*, 2003).

Wie der *morning* und *evening peak* wird die Siesta auch unter anderem durch die Uhrneurone kontrolliert, wobei aber noch nicht genau klar ist, welche Uhrneurone für diese „Mittagsruhe“ zuständig sind. Sie beginnt unter Laborbedingungen, wenn die Aktivität nach dem *morning peak* wieder abgenommen hat und endet, wenn die Aktivität zum *evening peak* erneut ansteigt (Isaac *et al.*, 2009; Schlichting *et al.*, 2015). Doch ist die Siesta nicht festgelegt und unter natürlichen Bedingungen wird diese auch als Anpassung des Organismus an jahreszeitliche Temperaturen und Tageslängen bezeichnet, um die günstigen Temperaturen und das Tageslicht z.B. für die Futtersuche auszunutzen (Collins *et al.*, 2004; Isaac *et al.*, 2009; Majercak *et al.*, 1999).

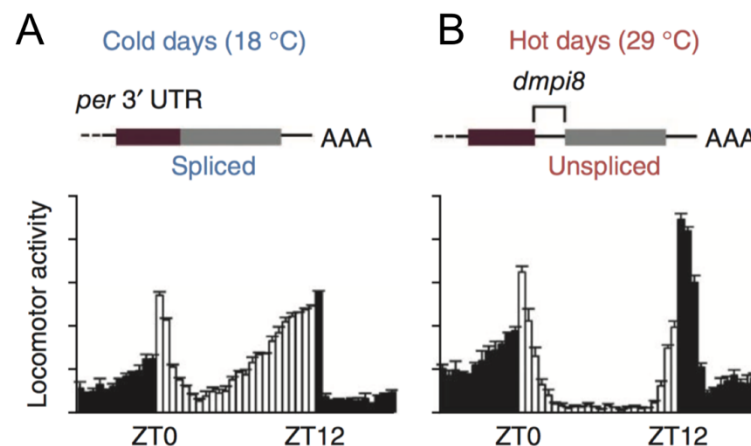


Abbildung 9: Circadiane Lokomotoraktivität an kalten und heißen Tagen. An kalten Tagen (18°C) wird das Intron *dmp18* aus der 3'UTR der *per*-mRNA herausgespleißt. Dies hat zur Folge, dass der Anstieg zum *evening peak* bereits früher beginnt und somit die Siesta kürzer ausfällt (A). An heißen Tagen verbleibt das *dmp18*-Intron in der 3'UTR der *per*-mRNA, die Fliegen weisen dann verminderte Aktivität während des heißen Tages auf und verbleiben länger in der Siesta (B) (Abb. nach Lim und Allada, 2013).

So beginnt an kälteren und/oder kürzeren Tagen die ansteigende Aktivität zum *evening peak* bereits früher. Zur molekularen Regulation der Siesta ist bisher bekannt, dass diese durch alternatives Spleißing eines Introns in der 3'UTR, genannt *dmp18*, von *per* reguliert wird. Dieses Spleißing ist abhängig von der Temperatur bzw. Tageslänge. Bei hohen

Temperaturen oder langer Photoperiode können vermehrt *per*-Transkripte mit *dmpi8*-Intron detektiert werden, dies verlangsamt die Translation, wodurch die Menge an Period-Protein langsamer ansteigt und die Aktivität erniedrigt bleibt. Wird das *dmpi8*-Intron dagegen aufgrund niedriger Temperaturen oder kurzer Photoperiode herausgespleißt, erreicht die Period-Proteinmenge früher ihren Höhepunkt und als Folge nimmt die Aktivität früher zu (Abb. 9; Cheng *et al.*, 1998; Majercak *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2004). Der exakte Mechanismus, wie die unterschiedlichen Temperaturen registriert werden und wie dies zum alternativen Spleißing führt, ist bisher nicht verstanden. Eine entscheidende Rolle scheinen NorpA und der thermosensitive Kationenkanal TrpA1 zu spielen. So weisen *norpA*-mutante Fliegen eine höhere Menge von *per*-Transkripten ohne *dmpi8*-Intron auf. *trpA1*-mutante Fliegen zeigen eine erhöhte Aktivität während der Siesta und neben den Uhrneuronen werden thermosensorische Neurone, welche TRPA1 exprimieren, für die Siesta benötigt, die wahrscheinlich den thermosensorischen Input für die Uhrneurone liefern (Collins *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2016; Majercak *et al.*, 2004; Roessingh *et al.*, 2015).

1.6 Gustatorische Rezeptorneurone in *Drosophila melanogaster*

Für das Überleben eines Organismus ist es äußerst wichtig, zwischen giftigen Substanzen und nährstoffreicher Nahrung unterscheiden zu können. Um dies zu bewerkstelligen besitzt *Drosophila melanogaster* neben dem olfaktorischen ein ausgeprägtes gustatorisches System. Im Gegensatz zum Menschen sind bei *Drosophila melanogaster* die gustatorischen Sensillen, die der Geschmackserkennung dienen, nicht alle auf einen Teil des Körpers beschränkt (Amrein und Thorne, 2005; Montell, 2009).

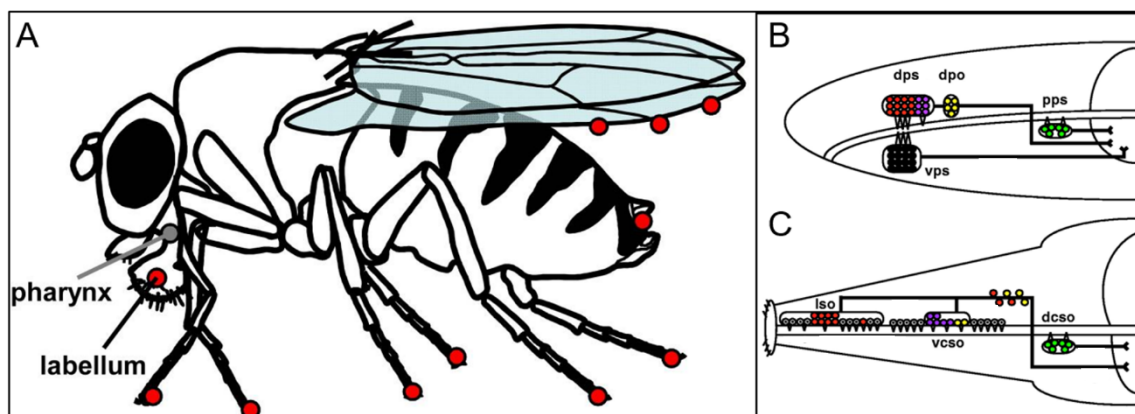


Abbildung 10: Verteilung der gustatorischen Neurone auf der ganzen Fliege und im larvalen und adulten Pharynx. Gustatorische Neurone befinden sich im Labellum, Pharynx, an Beinen, Flügeln und am Eiablageapparat (A). Im larvalen Pharynx befinden sich gustatorische Neurone im ventralen

Pharynxsinnesorgan (vps), im dorsalen Pharynxsinnesorgan (dps), im dorsalen Pharynxorgan (dpo) und posterioren Pharynxsinnesorgan (pps) (B). Während der Metamorphose werden diese Organe umgewandelt und die gustatorischen Neurone in neuen Organen organisiert. Die Neurone, die in der Larve entstehen und in der adulten Fliege erhalten bleiben, sind mit der gleichen Farbe gekennzeichnet. Schwarze Neurone werden durch Apoptose entfernt, graue werden erst während der Pupalphase erzeugt. Adult sitzen die gustatorischen Neurone im labialen Sinnesorgan (lso) und dem dorsalen (dcso) und ventralen cibarialen Sinnesorgan (vcso) (C) (Abb. A nach Montell, 2010; Abb. B, C nach Gendre *et al.*, 2004).

Diese gustatorischen Sensillen sitzen im Proboscis, den Beinen, den Flügeln und bei Weibchen im Eiablageapparat (Abb. 10A) (Stocker, 1994). Im Proboscis befinden sich diese auf den Labialpalpi und im pharyngalen, labialen Sinnesorgan (lso), dem dorsalen (dcso) und ventralen, pharyngalen, cibarialen Sinnesorgan (vcso) (Abb. 10C). Ein Teil der Neurone der pharyngalen gustatorischen Neurone existiert bereits in der Larve im dorsalen Pharynxorgan (dpo), dorsalen Pharynxsinnesorgan (dps), ventralen Pharynxsinnesorgan (vps) und posterioren Pharynxsinnesorgan (pps) (Abb. 10B; Gendre *et al.*, 2004).

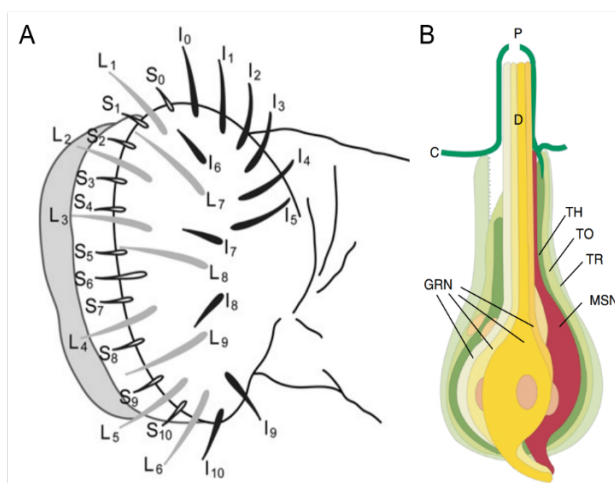


Abbildung 11: Lage der gustatorischen Sensillen auf dem Labialpalpus und Aufbau einer einzelnen Sensille. Auf dem Labialpalpus sitzen 31 bis 34 gustatorische Sensillen, die in kurze (S), intermediäre (I) und lange (L) Sensillen unterteilt werden (A). Eine Sensille besteht aus vier gustatorischen Neuronen (GRN), einem mechanosensorischen Neuron (MSN) und ist an der Spitze durch eine Pore geöffnet (B). C = Cuticula, TH = thekogene Zelle, TO = tormogene Zelle, TR = trichogene Zelle, D = Dendrit. (Abb. A nach Amrein und Thorne, 2005; Abb. B nach Weiss *et al.*, 2011).

Auf einem Labialpalpus befinden sich 31 bis 34 gustatorische Sensillen (Wang *et al.*, 2004). Diese können durch ihre Morphologie in kurze, intermediäre und lange Sensillen unterschieden werden (Abb. 11A). Die kurzen und langen Sensillen werden durch vier gustatorische und ein mechanosensorisches Neuron innerviert. Die gustatorischen Neurone dienen jeweils der Erkennung von Wasser, Zucker, niedriger Salz- und hoher Salzkonzentration (Abb. 11B). Das Neuron, das hohe Salzkonzentration erkennt, dient gleichzeitig der Detektion von Bitterstoffen in kurzen und intermediären Sensillen. In den intermediären Sensillen befinden sich nur die Axone eines mechanosensorischen Neurons und zweier gustatorischer Neurone, eines das Zucker und niedrige Salzkonzentrationen und eines das Bitterstoffe und hohe Salzkonzentrationen detektieren kann (Jiao *et al.*, 2008; Montell, 2009). Die Axone der gustatorischen Neurone des Proboscis projizieren

larval und adult in das Subösophagalganglion (SOG) (Colomb *et al.*, 2007; Dunipace *et al.*, 2001). Dabei projizieren aber gustatorische Neurone, die unterschiedliche Stoffe detektieren, in unterschiedliche Areale des SOG (Wang *et al.*, 2004).

Die Spezifität der einzelnen, gustatorischen Neurone kommt durch die differentielle Expression transmembraner, gustatorischer Rezeptoren (Gr) zustande. Zum Beispiel dienen Gr64a und Gr5a der Wahrnehmung von Zucker und sind in den zuckererkennenden Neuronen exprimiert, Gr66a und Gr93a registrieren dagegen Bitterstoffe und sind in Neuronen, die hohe Salzkonzentrationen detektieren, exprimiert (Dahanukar *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009). Gustatorische Rezeptoren bilden multimere Komplexe mit anderen GRs, um funktionsfähig zu sein (Jiao *et al.* 2008; Lee *et al.*, 2010).

1.7 Aufbau des Komplexauges

In der vorausgegangenen Masterarbeit wurde bereits der Aufbau und die Entwicklung des Komplexauges eingehend beschrieben (Raß, 2012). Da in dieser Arbeit die Funktion von Fuss, ein möglicher Dpp-Signalweg Inhibitor, analysiert wurde, wird nachfolgend hauptsächlich herausgestellt, welche Aufgaben Dpp während der Augenentwicklung erfüllt. Das Komplexauge von *Drosophila melanogaster* besteht aus ungefähr 800 einzelnen Ommatidien. Ein Ommatidium setzt sich aus den acht Photorezeptoren R1-R8, vier Kegelzellen, zwei primären, sechs sekundären, drei tertiären Pigmentzellen und drei Borstenzellen zusammen (Ready *et al.*, 1976).

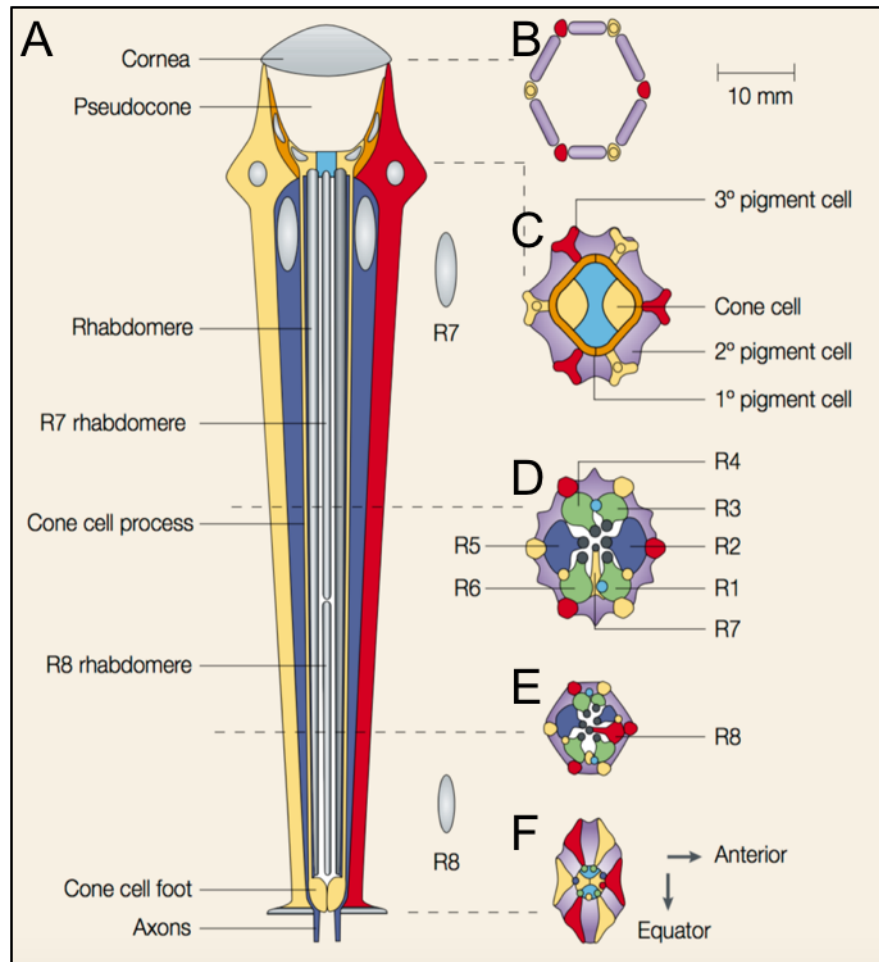


Abbildung 12: Schematische Darstellung eines Ommatidiums im Quer- und Längsschnitt. Längsschnitt (A), Querschnitt von apikal nach basal (B-F). Längsschnitt zeigt die Borstenzelle (gelb) und tertiäre Pigmentzelle (rot), die Linse (*cornea* und *pseudocone*), die Kegelzellen, die außenliegenden Rhabdomere und das R7-Rhabdomer, das über dem R8-Rhabdomer liegt (A). Borstenzelle, sekundäre und tertiäre Pigmentzellen (B). Borstenzelle, primäre, sekundäre sowie tertiäre Pigmentzellen und Kegelzellen (C). Lage der einzelnen Photorezeptoren R1 - R8 und deren Rhabdomere (D-F) (Abb. nach Kumar, 2001).

Die Photorezeptoren dienen dabei der Wahrnehmung von Licht. Um dies zu gewährleisten, enthalten sie photoaktive Pigmente, die Rhodopsine. Diese befinden sich in Rhabdomeren, welche mikrovilläre Ausstülpungen der Photorezeptoren sind (Kumar und Ready, 1995). Die Rhabdomere, der sechs äußeren Photorezeptoren R1-R6 liegen um die zwei inneren Photorezeptoren R7 und R8, wobei das Rhabdomer des R7-Photorezeptors über dem des R8-Photorezeptors liegt (Ready *et al.*, 1976). Mittels dieser Rhabdomere wird Licht in elektrisches Signal umgewandelt und in die optischen Loben des Gehirns weitergeleitet (Stavenga und Arikawa, 2008). Die Kegelzellen sezernieren die Linse und die Pigmentzellen isolieren optisch das Ommatidium von den anderen Ommatidien. Die Pigmentzellen tragen zur Erhöhung der Schärfe bei (Abb. 12, Ready *et al.*, 1976; Tomlinson, 2012).

1.8 Entwicklung des Auges

1.8.1 Antagonistische Wirkung des Dpp- und Wg-Signalwegs bei der Augenentwicklung

Das Komplexauge entsteht aus der Augenimaginalscheibe, die während der Embryonalentwicklung angelegt wird und in der frühen Erstinstarlarve aus 20 Zellen besteht (Ready *et al.*, 1976). Wingless (Wg) wird dabei bereits in Augenimaginalscheiben von Erstinstarlarven exprimiert, sorgt für die Proliferation sowie Wachstum der Augenimaginalscheibe und inhibiert die Differenzierung bis zum Beginn des dritten Larvenstadiums, indem es die Expression von Dpp verhindert (Baonza und Freeman, 2002; Cho *et al.*, 2000; Treisman und Rubin, 1995).

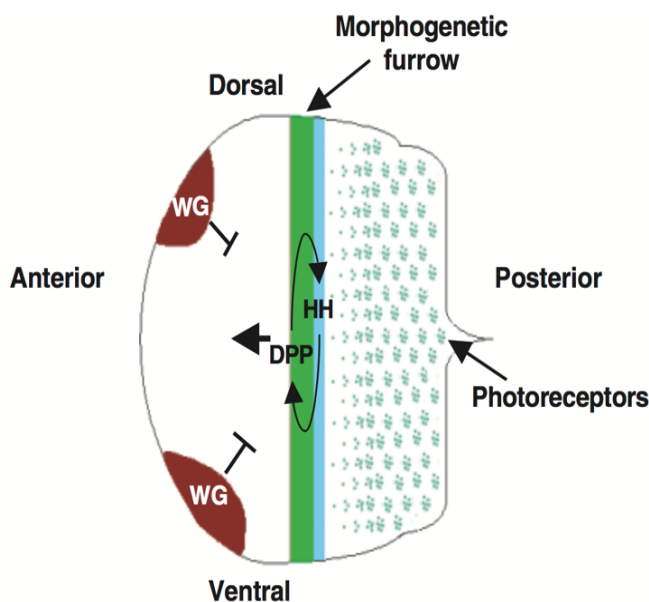


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Progression der morphogenetischen Furche. Die Photorezeptoren sezernieren Hedgehog (Hh), welches in einem Streifen, die morphogenetische Furche, anterior zu den Photorezeptoren Dpp-Expression aktiviert und diese Zellen erneut zu Hh-sezernierenden Photorezeptoren differenzieren. Somit wird die Bewegung der morphogenetischen Furche gewährleistet. Wingless wird von den anterior ventral und dorsal gelegenen Zellen exprimiert und verhindert dort die Photorezeptordifferenzierung. Diese Zellen bilden die Kopfkutikula aus (Abb. nach Silver und Rebay, 2005).

Mit zunehmendem Wachstum der Augenimaginalscheibe entfernt sich der posteriore Rand von den Wg-sekretierenden Zellen. Im zweiten Larvenstadium kann Dpp durch Wg nicht mehr inhibiert werden und Dpp wird am posterioren Rand exprimiert (Lee und Treisman, 2001; Treisman und Rubin, 1995). Gleichzeitig wird durch die Dpp-Expression die Expression von Wg auf die anterioren, lateralen Ränder beschränkt (Chanut und Heberlein, 1997). Daraufhin bildet sich zu Beginn des dritten Larvenstadiums die morphogenetische Furche, die Dpp exprimiert, am posterioren Rand und wandert nach anterior. Während die Zellen anterior zur morphogenetischen Furche proliferieren, beginnt der Großteil in und hinter der morphogenetischen Furche zu Zellen der Ommatidien zu differenzieren (Ready *et al.*, 1976). Nach der Etablierung wird die morphogenetische Furche dadurch aufrechterhalten, dass die Photorezeptorzellen, die

sich posterior zur Furche entwickeln, Hedgehog (Hh) sezernieren. Hh aktiviert in den Zellen anterior zu den Photorezeptoren die Expression von Dpp, woraufhin diese Zellen zu Photorezeptorzellen differenzieren und wiederum Hh exprimieren, was letztlich zur Progression der morphogenetischen Furche führt (Heberlein *et al.*, 1993). Die anterior dorsal und ventral gelegenen Wg-exprimierenden Zellen hemmen dort die Photorezeptordifferenzierung und dieser Teil der Augenimaginalscheibe bildet später Kopfkutikula (Abb. 13; Treisman und Rubin, 1995).

1.8.2 Einfluss des Dpp-Signalwegs auf das Retinal Determination Gene Network

Bevor die morphogenetische Furche über die Augenimaginalscheibe wandert, werden bereits die Gene des *Retinal Determination Gene Networks* (RDGN) exprimiert, welche für die Entwicklung des Auges benötigt werden.

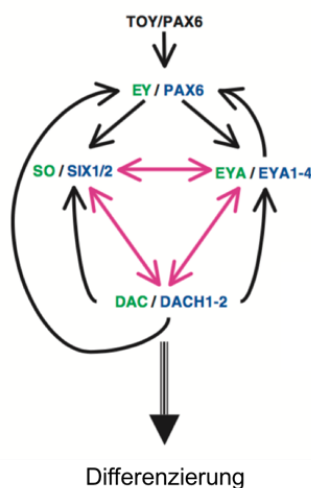


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Retinal Determination Gene Networks. Zu diesem zählen Twin of Eyeless (Toy), Eyeless (Ey), Sine oculis (So), Eyes absent (Eya) und Dachshund (Dac) in *Drosophila melanogaster*. Die homologen, humanen Proteine sind blau dargestellt (Abb. nach Silver und Rebay, 2005).

Das RDGN besteht unter anderem aus den Genen *twin of eyeless* (*toy*), *eyeless* (*ey*), *sine oculis* (*so*), *eyes absent* (*eya*) und *dachshund* (*dac*). Ausfall eines einzelnen dieser Gene führt zum partiellen bis kompletten Verlust des adulten Auges (Jemc und Rebay, 2007). *eyeless* kodiert für das *Drosophila melanogaster* Homolog von *Pax-6* in Vertebraten. In der Kaskade des RDGN befindet sich *ey* über *eya*, *so* und *dac*. (In *Drosophila melanogaster* findet sich zudem ein weiteres PAX-6 Homolog, *toy*, welches sich im RDGN *upstream* von *ey* befindet (Czerny *et al.*, 1999)). Während der Embryonalentwicklung wird Ey zunächst in der Augenanlage und während der ersten und zweiten Larvenphase in der gesamten Augenimaginalscheibe exprimiert. Sobald sich die morphogenetische Furche bildet, wird *eyeless* anterior, aber nicht posterior zu dieser exprimiert (Halder *et al.*, 1995). Kurz vor der Initialisierung der morphogenetischen

Furche kann die Expression der Gene *eyes absent*, *sine oculis* und *dachshund* am posterioren Rand der Augenimaginalscheibe detektiert werden. Während der Progression der morphogenetischen Furche werden *eya*, *so* und *dac* anterior und posterior zu dieser exprimiert (Shen und Mardon, 1997; Halder *et al.*, 1998). Die Expression der Gene *eya*, *so* und *dac* wird durch Ey und Dpp aktiviert (Chen *et al.*, 1999). Posterior zur morphogenetischen Furche ist die Expression dieser Gene unabhängig von Dpp und Ey (Curtiss und Mlodzik, 2000). Versuche zeigten, dass Eya mit So bzw. Dac interagieren kann und diese Proteine die Expression anderer Gene des RDGN und ihre eigene Expression regulieren können, was schließlich zur Differenzierung des Auges führt (Abb. 14; Jemc und Rebay, 2007).

1.8.3 Inhibierung des Zellzyklus durch den Dpp-Signalweg

Neben der Aktivierung der Expression der Gene des RDGN *eyes absent*, *sine oculis* und *dachshund*, hat der Dpp-Signalweg eine weitere Funktion während der Augenentwicklung. Zellen anterior sowie in der morphogenetischen Furche hören auf zu proliferieren und bleiben in der G1-Phase des Zellzyklus stehen. Dieser Arrest kommt dadurch zu Stande, dass die Zellen innerhalb der morphogenetischen Furche Dpp exprimieren und dieses Morphogen anterior und innerhalb der Furche den Dpp-Signalweg aktiviert. Dies führt zur Differenzierung eines Teils dieser Zellen (Escudero und Freeman, 2007; Horsfield *et al.*, 1998). Diese Zellen bilden hinter der morphogenetischen Furche das *precluster* aus, welches aus den Photorezeptorzellen R2 - R5 und R8 besteht. Der Teil der Zellen, die nicht zu Photorezeptoren differenzieren, befinden sich hinter der morphogenetischen Furche synchron in der S-Phase und durchlaufen eine weitere Zellteilung. Die zweite mitotische Welle gewährleistet, dass genügend Zellen für die sequenzielle Rekrutierung von R1-, R6- sowie R7-Photorezeptorzelle, Kegelzellen, Pigmentzellen und Borstenzellen vorhanden sind (Cagan und Ready, 1989; de Nooij und Hariharan, 1995).

1.9 Das MiMIC-Transposon-System

Eine vielfach verwendete Strategie, um Gene in *Drosophila melanogaster* zu manipulieren, ist, Transposons zufällig ins Genom integrieren zu lassen und folglich Gene direkt durch die Insertion des Transposons oder indirekt durch nachträgliches Ausschneiden dieser Transposons aus dem Genom zu mutieren (Cooley *et al.*, 1988; Thibault *et al.*, 2004). Zusätzlich wurden auch mit Transposons Reportergene wie Gal4 oder LacZ integriert, um die Expression von Genen untersuchen zu können (Bier *et al.*,

1989; Brand und Perrimon, 1993). Eine Vielzahl in jüngster Zeit erzeugter Mutanten wurde mit dem sogenannten MiMIC (*Minos mediated integration cassette*)-Transposon generiert (Venken *et al.*, 2011).

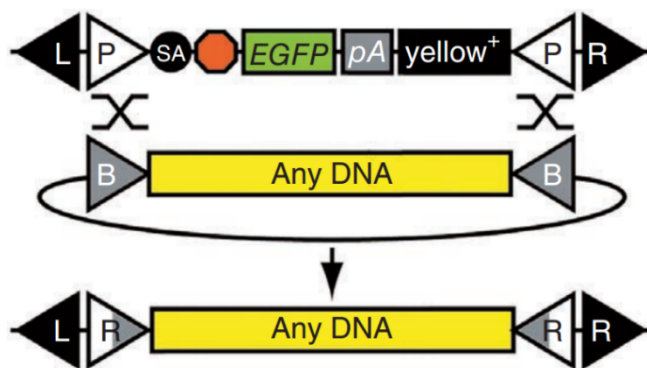


Abbildung 15: Das MiMIC-Transposon. Das MiMIC-Transposon besteht aus zwei *inverted repeats* des Minos-Transposons (L und R), zwei attP-Rekombinationsstellen (P), einer Spleißakzeptorstelle (SA), drei Stopcodons (rotes Stopzeichen), einem eGFP-Reportergen (EGFP), einem Polyadenylierungssignal (pA) und einem dominanten $yellow^+$ -Marker (Abbildung nach Venken *et al.*, 2011).

Dieses Transposon besteht aus zwei *inverted repeats* des Minos-Transposons, denen jeweils eine attP-Rekombinationsstelle folgt. Innerhalb dieser attP-Rekombinationsstelle sitzt die *gene trap*-Kassette. Diese setzt sich aus einer Spleißakzeptorstelle, drei Stopcodons, einem GFP-Reportergen, einem Polyadenylierungssignal und einem $yellow^+$ -Marker zusammen. Der $yellow^+$ -Marker wurde beim Mutagenesecscreen als Selektionsmarker verwendet, da die Konstrukte in y^- -Fliegen injiziert wurden (Abb. 15).

Dieses Transposon bietet mehrere Vorteile. Da das Minos-Transposon präferentiell in Introns integriert, fanden 33% aller Integrationsereignisse des MiMIC-Transposons in Introns statt (Metaxakis *et al.*, 2005). Die Translation wird dann durch die Stopcodons bzw. die Transkription durch das Polyadenylierungssignal unterbrochen. Das GFP ermöglicht Expressionsanalysen des inserierten Gens und im Gegensatz zu früheren Transposons kann hier mit Hilfe der attP-Rekombinationsstellen die *gene trap*-Kassette mit jeglicher DNA ausgetauscht werden. Eine Vielzahl von Vektoren um u.a. Gal4-, LexA- oder *protein trap*-Linien aus den *gene traps* zu erzeugen, wurde beim *Drosophila Genomics Research Center* bereits hinterlegt.

Mittlerweile wurden 7441 Fliegenlinien erzeugt, die jeweils eine einzelne MiMIC-Insertion besitzen, darunter zwei Fliegenlinien, bei denen das MiMIC-Transposon im *fuss*-Lokus inserierte. Dabei handelt es sich um die Linien Mi13731 und Mi03207.

1.10 Zielsetzung der Arbeit

In der vorrangegangenen Masterarbeit wurde damit begonnen, die Funktion von Fuss durch Überexpressionen in der Augenscheibe zu analysieren. Um jedoch einen Einblick in die endogene, biologische Funktion von Fussel zu bekommen, sind Experimente zur endogenen Expression und Funktion notwendig, die dann, gemeinsam mit den Überexpressionsdaten, zu einem Gesamtkonzept zusammengestellt werden können.

Damit dieses Ziel erreicht werden kann, ist es wichtig, die notwendigen Werkzeuge zur Analyse der endogenen Funktion, insbesondere spezifische Antikörper gegen das Fussel-Protein und Mutationen im *fuss*-Gen, zu erzeugen. Für die Herstellung spezifischer Antikörper soll eine optimierte Expression des Fussel-Proteins in *E. coli* etabliert werden, um mit einem aufgereinigten Protein eine Immunisierung zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums erzeugen zu können. Die Antiseren sollen für eine umfangreiche, entwicklungs- und gewebsspezifische Expressionsanalyse von Fussel eingesetzt werden. Parallel dazu sollen mittels RNAi-Linien und/oder Fuss-Mutanten bisher veröffentlichte Daten zur Funktion überprüft und erweitert werden. Dabei sollten ein genau definiertes Expressionsmuster und die Lokalisierung des Proteins die Suche nach spezifischen Phänotypen in Fuss-Mutanten wesentlich erleichtern. Je nach Überlebensrate der Fuss-Mutanten sollen dabei sowohl Defekte in der Entwicklung wie auch im Verhalten untersucht werden.

Schließlich soll die in Augenscheiben identifizierten, zellulären Auswüchse weiter untersucht werden, um die molekularen Ursachen einer verstärkten Proliferation aufklären zu können.

2 Ergebnisse

2.1 Expression von Fussel für die Herstellung von polyklonalen anti-Fuss-Antikörper

Für die Analyse der endogenen Funktion von Fuss und dessen Expression war es von entscheidender Bedeutung ein polyklonales Antiserum gegen Fuss zu erzeugen. Im ersten Schritt war es notwendig eine stabile Expression des Fuss-Proteins aufzubauen. Nachfolgend wird aufgezeigt, welche Versuche zur Expression von Fuss unternommen wurden, die dann letztlich zur Etablierung der richtigen Strategie und zur Erzeugung spezifischer Antikörper gegen Fuss führten.

2.1.1 Expression der *fussB*-Spleißform in *E. coli*

Als Expressionssystem wurde *E. coli* gewählt, da dieses ein sehr einfach zu handhabendes und schnelles System zur Erzeugung großer Mengen an Protein darstellt. Zudem stehen eine Vielzahl unterschiedlicher Expressionsvektoren sowie *E. coli*-Stämme zur Verfügung und die Expression von Fuss konnte im lehrstuhleigenen Labor durchgeführt werden.

Die kodierende Sequenz der *fussB*-Spleißform (Abb. 5) wurde in den Vektor pGEX-4T3 kloniert. Dieser Vektor ist ein *E. coli*-Expressionsvektor, der es ermöglicht, C-terminal GST-getaggte Proteine zu exprimieren. Die *fussB*-Spleißform wurde gewählt, da es sich hierbei, wie unter 1.4 erwähnt, um die spezifisch exprimierte Spleißform handelt. Als *E. coli*-Stamm wurden Rosetta2TM-Zellen verwendet. Diese Zellen enthalten ein zusätzliches Plasmid, das tRNAs für selten genutzte Codons codiert, um die Expression eukaryotischer Gene zu verstärken.

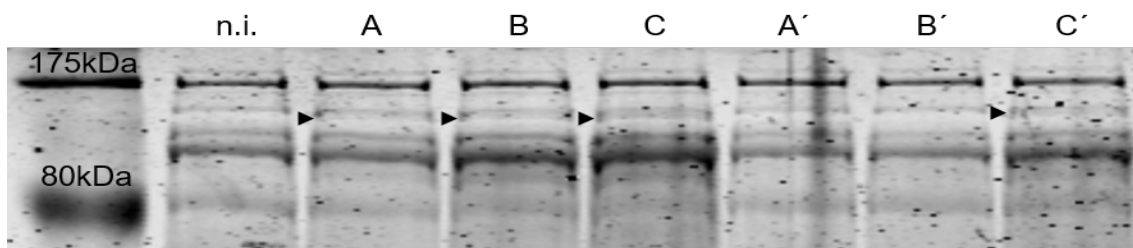


Abbildung 16: Expressionsanalyse der FussB-Spleißform. Expression von FussB-GST (111kDa) wurde mit 0,5mM (A, A'), 1,0mM (B, B') oder 2,0mM IPTG (C, C') induziert und 3h (A - C) bzw. 6h (A' - C') lang durchgeführt. Nur eine schwache zusätzliche Bande (Pfeilspitze) kann in den Spuren A - C bzw. C' des Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgels bei der erwarteten Größe im Gegensatz zur nicht induzierten Kontrolle (n.i.) detektiert werden.

Für die Expression von FussB-GST (111kDa) wurden verschiedene IPTG-Konzentrationen (0,5mM, 1,0mM, 2,0mM), Temperaturen (18 – 37°C, nicht gezeigt) und unterschiedliche Dauer (3h, 6h) getestet, dennoch konnte nur eine sehr schwache Expression von FussB-GST nachgewiesen werden (Abb. 16).

2.1.2 Optimierung der Codonsequenz von *fussB* für die Expression in *E. coli*

Ein kritischer Punkt für die Expression von eukaryotischen Proteinen in *E. coli* ist die Häufigkeit selten genutzter Codons in der codierenden Sequenz. Diese ist mit dem *codon adaptation index* (CAI) berechenbar und ergibt für die endogene Sequenz von *fussB* einen Wert von 0,62, was eine geringe Exprimierbarkeit von *fussB* in *E. coli* bedeutet. Um die Codonsequenz an *E. coli* anzupassen, wurde deswegen eine Optimierung der Codonsequenz bei GeneartTM vorgenommen. Dies verbesserte den CAI von 0,62 auf 0,95.

2.1.3 Expression der optimierten Codonsequenz von *fussB* in *E. coli*

Die optimierte Codonsequenz von *fussB* (*fussB-opt*) wurde in den Vektor pGEX-4T3 kloniert und somit C-terminal mit GST getaggt.

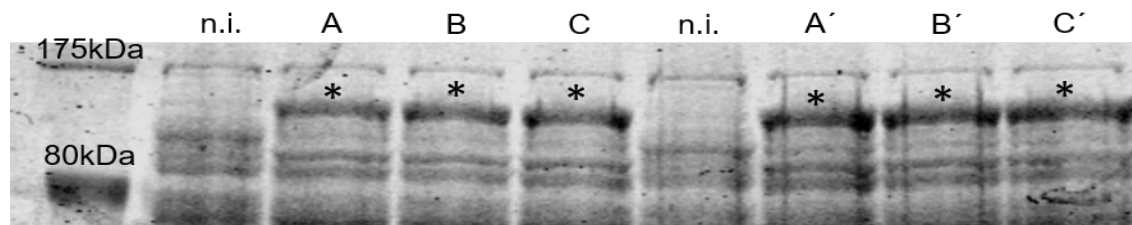


Abbildung 17: Expressionsanalyse der codonoptimierten GST-getaggten FussB-Spleißform. Bei allen IPTG-Konzentrationen (A, A': 0,5mM, B, B': 1,0mM, C, C': 2,0mM) und Expressionslängen (A - C: 3h, A' - C': 6h) kann eine zusätzliche starke Bande (Stern) im Gegensatz zur nicht induzierten Kontrolle (n.i.) im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel bei der erwarteten Größe (111kDa) detektiert werden.

FussB-opt-GST wurde in Rosetta2TM-Zellen mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen (0,5mM, 1,0mM, 2,0mM) und unterschiedlich lang (3h, 6h) bei 37°C exprimiert. Durch die Optimierung der Codonsequenz konnte eine starke Expression erreicht werden (Abb. 17).

2.1.4 Aufreinigung von FussB-opt-GST

Bei der Aufreinigung von FussB-opt-GST mit Hilfe von Glutathion-Cellulosebeads im Batch-Verfahren zeigte sich, dass der Großteil des exprimierten Proteins in der unlöslichen Phase vorlag und nur ein sehr geringer Teil löslich war. Somit konnten nur

geringe Mengen von FussB-opt-GST aufgereinigt werden (Abb. 18). Dies bedeutet, dass womöglich aufgrund der Größe von FussB-opt-GST oder der Expressionsstärke der Großteil von FussB-opt-GST in sogenannten Einschlusskörperchen vorliegt. Diese Einschlusskörperchen sind Ansammlungen falsch gefalteter Proteine. Weiter könnte FussB-opt-GST bei den verwendeten Pufferbedingungen einfach nicht löslich sein und somit ausfallen. Um die Menge von löslichem FussB-opt-GST zu erhöhen wurden neben PBS (pH 7,4) auch Natriumphosphatpuffer (pH 5,8) und verschiedene Detergenzien (TritonX oder Sarcosyl) verwendet. Die Expressionsbedingungen wurden auch variiert. Dies alles führte aber zu keiner Verbesserung der Löslichkeit von FussB-opt-GST (nicht gezeigt).

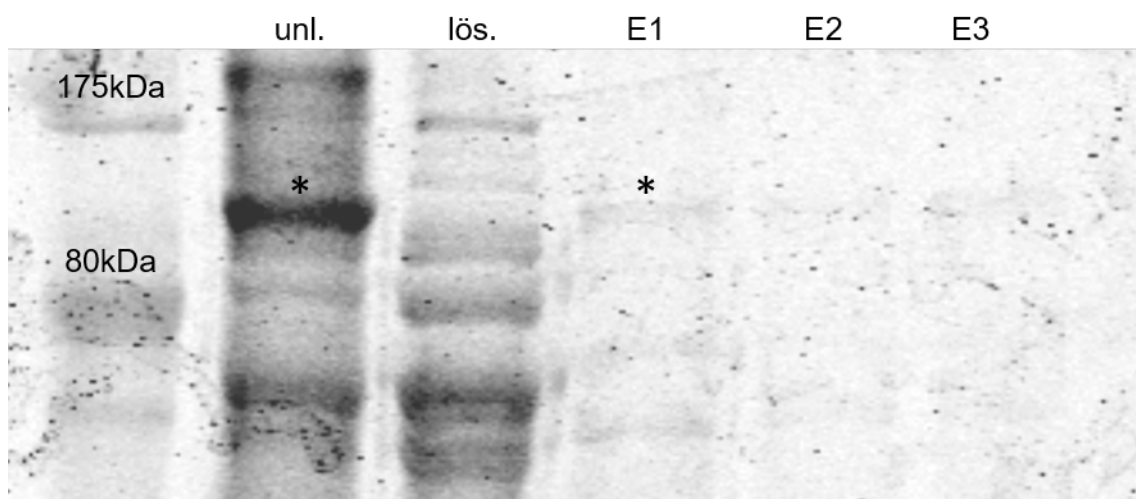


Abbildung 18: Aufreinigung der C-terminalen GST-getagten FussB-Spleißform. Ein Großteil von FussB-opt-GST (Stern) liegt in der unlöslichen Phase (unl.) vor. Nur ein geringer Anteil, der im Coomassiegefärbten SDS-Polyacrylamidgel nicht detektiert werden konnte, befindet sich in der löslichen Phase (lös.). Eine geringe Menge FussB-opt-GST kann von der Säule eluiert werden (Stern, E1 - E3). unl. = unlösliche Phase. lös. = lösliche Phase. E = Eluat.

Analog dazu waren auch Versuche erfolglos ein C-terminal His-getagtes Fuss zu exprimieren. Dieses Fusionsprotein war ebenfalls unlöslich (Schmid, 2013).

2.1.5 Design eines löslichen Fragments von Fuss

Da bisherige Aufreinigungsversuche an der Unlöslichkeit des Volllängenproteins scheiterten, sollte nur ein Teil von Fussel exprimiert werden, welcher folgende Eigenschaften besitzt:

Es sollte ein nichtkonservierter Abschnitt von Fussel sein, um spätere Kreuzreaktionen der Antikörper zu minimieren. Ebenso sollte das Fragment möglichst klein sein, damit die Wahrscheinlichkeit, dass es richtig gefaltet wird, erhöht wird und somit keine Einschlusskörperchen bildet. Schließlich sollte es in PBS bei pH 7,4 löslich sein. Eine

wichtige Größe für die Unlöslichkeit von Proteinen bei einem bestimmten pH-Wert ist der isoelektrische Punkt (pI). Am isoelektrischen Punkt ist die Nettoladung des Proteins gleich null und dessen Löslichkeit am geringsten. Deswegen wurde der pI nichtkonservierter Abschnitte mit dem ProtParam-Programm untersucht und schließlich ein 139 Aminosäuren langes Fragment (Fussfrag-opt; Anhang 6.6) identifiziert, das einen pI von 4,7 besitzt und somit theoretisch in PBS löslich sein sollte. Weiter beinhaltet das Fragment keine konservierten Domänen (Abb. 19).



Abbildung 19: Schematische Darstellung des zu exprimierenden Abschnitts Fussfrag-opt von Fuss. Fussfrag-opt beinhaltet keine konservierten Domänen wie die Ski/Sno-Homologiedomäne oder Smad4-Bindedomäne und endet vor der Coiled Coil Domäne.

Um die Aufreinigung so einfach wie möglich zu gestalten, sollte das Fragment C-terminal mit einem 6xHis-Tag getaggt werden. Dieser Tag ist relativ klein und behindert somit nicht die natürliche Struktur des Fragments. Er besitzt nur eine niedrige Immunogenizität, wodurch er nicht abgespalten werden muss und weitere Aufreinigungsschritte entfallen.

2.1.6 Expression eines löslichen Fragments von Fuss in *E. coli*

Die optimierte Codonsequenz des *fuss*-Fragments wurde in den *E. coli*-Expressionsvektor pQE60 kloniert, um es als C-terminales 6xHis-getaggttes Fusselfragment (Fussfrag-opt-His) in Rosetta2TM-Zellen exprimieren zu können.

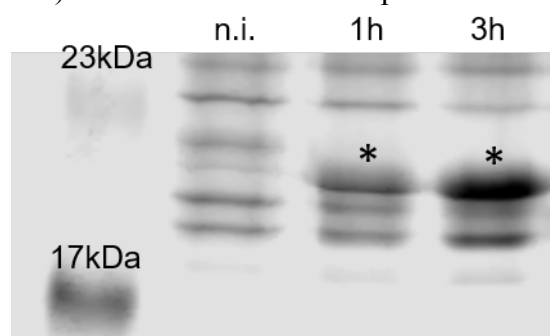


Abbildung 20: Expressionsanalyse eines C-terminal 6xHis-getaggtten Abschnitts des codonoptimierten Fuss. Fussfrag-opt-His (16,2kDa, Stern) kann nach 1h bzw. 3h im Gegensatz zur nicht induzierten Kontrolle (n.i.) im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel nachgewiesen werden.

Zuerst wurde die Exprimierbarkeit und die Expressionsstärke von Fussfrag-opt-His überprüft. Dazu wurde Fussfrag-opt-His durch Zugabe von 0,5mM IPTG 1h bzw. 3h lang exprimiert. Und es konnte eine starke Expression von Fussfrag-opt-His (16,2kDa) nach 3h detektiert werden (Abb. 20). Da Fussfrag-opt-His sich höher als erwartet im Gel befindet, wurde die Bande ausgeschnitten und am Lehrstuhl von Prof. Dr. Deutzmann mittels Massenspektrometrie sequenziert. Dies ergab, dass es sich bei der Bande wirklich um Fussfrag-opt-His handelt.

2.1.7 Aufreinigung von Fussfrag-opt-His

Daraufhin wurde versucht Fussfrag-opt-His mittels *cOmplete™ His-Tag Purification*-Säulen aufzureinigen.

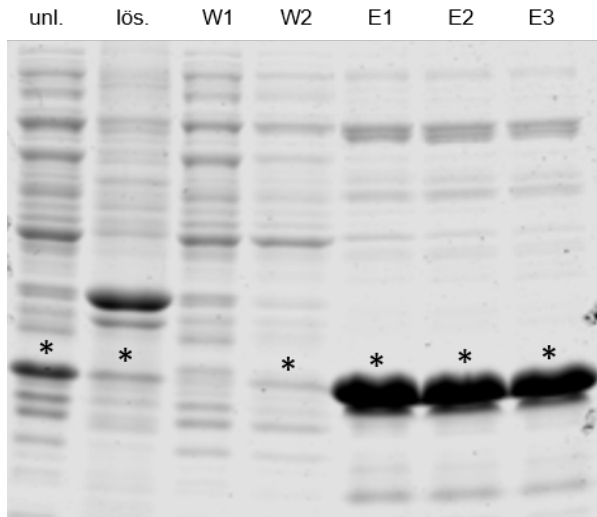


Abbildung 21: Aufreinigung von Fussfrag-opt-His nach dreistündiger Expression bei 37°C. Sowohl in der unlöslichen (unl.) als auch in der löslichen (lös.) Phase kann Fussfrag-opt-His (Stern) detektiert werden. Beim zweiten Waschschrift geht Fussfrag-opt-His verstärkt verloren. Fussfrag-opt-His kann in großen Mengen drei Mal eluiert werden. Die Analyse der einzelnen Schritte fand mit Hilfe eines Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgels statt. (E1 - E3). W = Waschschrift, E = Eluat.

Die Aufreinigung ergab, dass ein großer Anteil von Fussfrag-opt-His in der löslichen Phase vorlag, dieser auch stark aufkonzentriert und schließlich von der Säule eluiert werden konnte (Abb. 21). Die Säule wurde drei Mal eluiert, die Eluate wurden vereinigt und ergaben eine Konzentration von 1,2mg/ml.

2.1.8 Analyse unterschiedlicher Expressionsbedingungen von Fussfrag-opt-His

Ergänzend wurde überprüft, ob eine 18h lange Expression bei 20°C bzw. bei 37°C zu einer Verbesserung des Hintergrunds oder der Expressionsstärke führt.

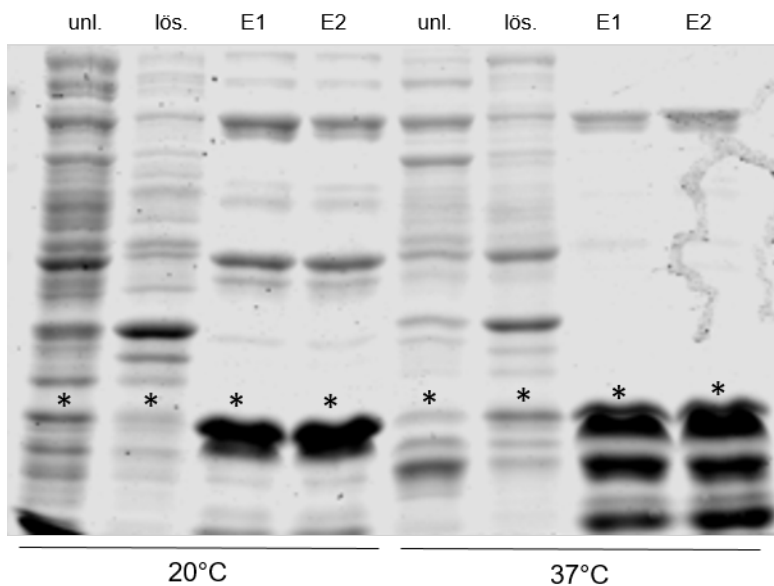


Abbildung 22: Aufreinigung von Fussfrag-opt-His nach 18h Expression bei 20°C bzw. 37°C. Nach 18h langer Expression von Fussfrag-opt-His (Stern) zeigt die Analyse des Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgels, dass der Hintergrund bei 20°C deutlich hervortritt (E1 - E2, 20°C). Bei 37°C wird Fussfrag-opt-His (*) nach 18h bereits degradiert und liegt vermehrt in der abgebauten Form vor (E1 - E2, 37°C). unl. = unlösliche Phase. lös. = lösliche Phase. E = Eluat.

Hierdurch erhöhte sich aber der Hintergrund bei der Expression bei 20°C erheblich und eine Expression bei 37°C hatte zur Folge, dass ein Großteil von Fussfrag-opt-His abgebaut wurde (Abb. 22).

2.1.9 Expression und Aufreinigung von Fussfrag-opt-His im großen Maßstab zur Antikörperherstellung

Um eine bessere Reinheit und höhere Ausbeute zu erreichen, wurde Fussfrag-opt-His in 2l *E. coli*-Kultur 3h lang exprimiert. Fussfrag-opt-His wurde anschließend mit dem *Äkta Basic 10 better Systems* aufgereinigt.

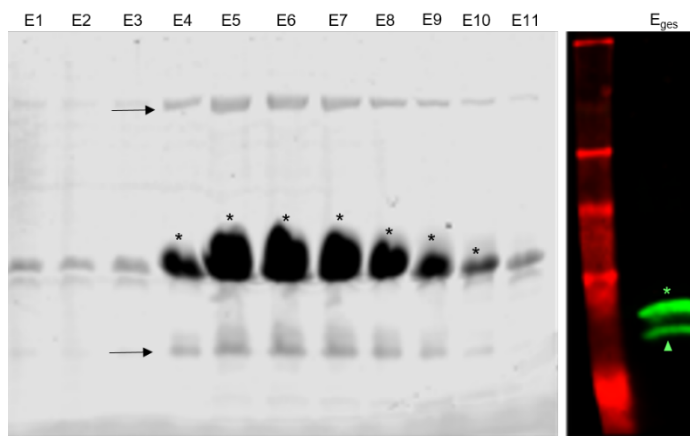


Abbildung 23: Analyse des aufgereinigten Eluats mittels Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgels und anti-His Immunoblot. Große Mengen Fussfrag-opt-His können in den Elutionen E4 – E10 nachgewiesen werden (Stern). Verunreinigungen durch *E. coli*-Proteine sind ebenfalls im Eluat vorhanden (Pfeile). Mittels eines Immunoblots kann nachgewiesen werden, dass es sich tatsächlich um Fussfrag-opt-His handelt (grüner Stern). Daneben kann auch ein bereits teilweise abgebautes Fussfrag-opt-His detektiert werden (grüne Pfeilspitze, E_{ges}). E = Eluat. E_{ges} = vereinigte Einzeleluat.

Die Eluate wurden mit einem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel analysiert und die Spuren E4 bis E10 beinhalten große Mengen an Fussfrag-opt-His, aber auch einen geringen Anteil an unspezifischen *E. coli*-Proteinen sowie abgebautem Fussfrag-opt-His. Die Eluate E4 bis E10 wurden vereinigt und eine Proteinkonzentration von 2,7mg/ml bestimmt. Mit einem anti-His Immunoblot konnte zudem gezeigt werden, dass es sich bei der starken Bande, die im Coomassiegefärbten SDS-Gel detektiert werden konnte, um Fussfrag-opt-His handelte. Wie vermutet konnte ebenfalls abgebautes Fussfrag-opt-His nachgewiesen werden (Abb. 22).

Die Injektion zur Antikörperherstellung wurde bei Davids Biotechnologie durchgeführt. Dort wurden zwei Kaninchen immunisiert und die polyklonalen Antikörperseren gegen das Eluat mittels Affinitätsreinigung aufgereinigt. Der Titer der im Tier1 erzeugten Antikörperlösung beträgt 1:80000, während der der im Tier2 erzeugten Antikörper

1:300000 beträgt. Sofern nicht anders angegeben, wurden in dieser Arbeit die aus Tier2 gewonnenen Antikörper verwendet (genannt anti-FussT2).

2.2 Überprüfen der polyklonalen Antikörperseren

2.2.1 Detektion von Fussfrag-opt-His mittels Immunoblotting durch die erzeugten Antikörper

Um zu überprüfen, ob die affinitätsgereinigten Antikörperlösungen in einem Immunoblot Fussfrag-opt-His detektieren können, wurde das Eluat in unterschiedlichen Mengen auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

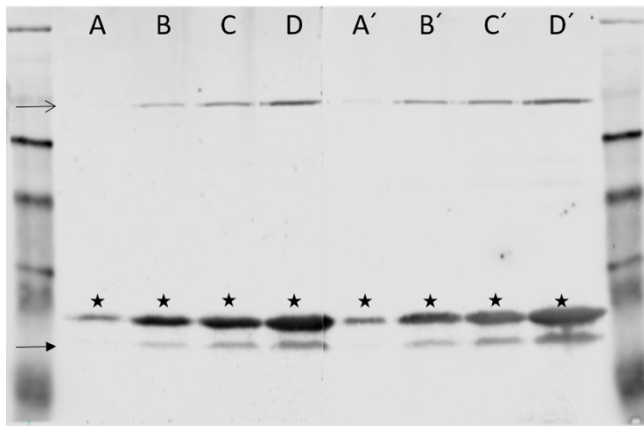


Abbildung 24: Detektion der im Eluat enthaltenen Proteine mit anti-FussT1 und anti-FussT2 mittels Immunoblotting. 0,1µg (A, A'), 0,5µg (B, B') 1µg (C, C') und 2µg (D, D') des Eluats wurden aufgetragen. Anti-FussT1 (1:1000; A - D) und anti-FussT2 (1:1000; A' - D') können bereits bei 0,1µg Fussfrag-opt-His (Stern) erkennen. Ab 0,5µg Eluat können beide Antikörper aber auch ein unbekanntes *E. coli*-Protein (offener Pfeil) und abgebautes Fussfrag-opt-His (geschlossener Pfeil) detektieren.

Die Antikörperlösungen anti-FussT1 (Abb. 24A - D) und antiFussT2 (Abb. 24A' - D') können in der Verdünnung 1:1000 bereits 0,1µg des Eluats (Abb. 24A, A') detektieren. Mit steigender Menge an Eluat erkennen die Antikörper neben Fussfrag-opt-His (Stern) sowohl das Abbauprodukt von Fussfrag-opt-His (Pfeil mit geschlossener Spitze) als auch das im Eluat enthaltene *E. coli*-Protein (Pfeil mit offener Spitze).

2.2.2 Detektion eines Fussel-GFP-Fusionsproteins mittels Immunoblotting durch die erzeugten Antikörper

Proteinextrakte aus Larven des Genotyps LSP-Gal4/+; UAS-Fuss-GFP/+, die Fuss-GFP im Fettkörper überexprimieren und aus Larven des Genotyps LSP-Gal4/+, die als Negativkontrolle dienten, wurden verwendet, um zu analysieren, ob anti-FussT1 bzw. anti-FussT2 ein Fusionsprotein aus Fuss und GFP detektieren können.

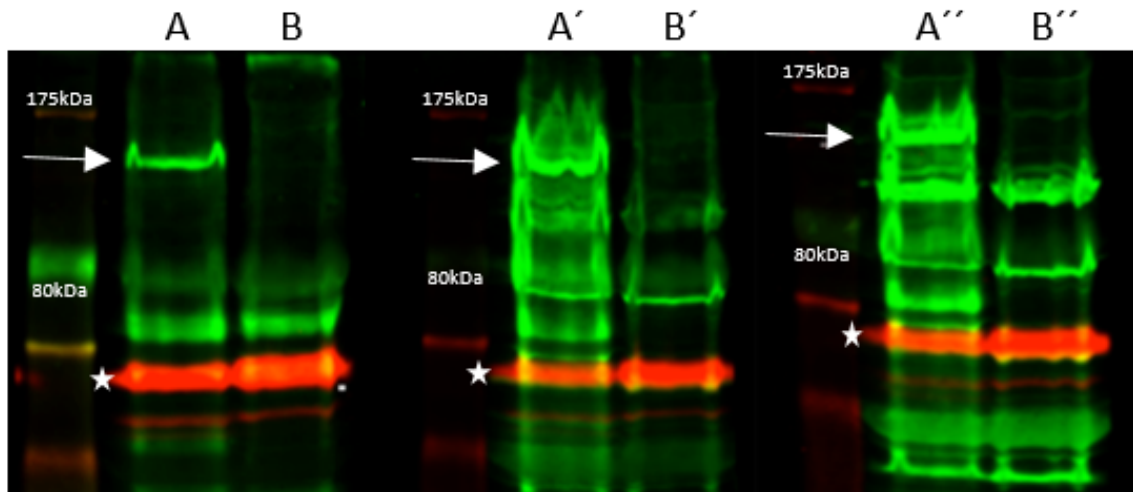


Abbildung 25: Detektion von Fuss-GFP mit anti-FussT1 und anti-FussT2. Fuss-GFP enthaltender Proteinextrakt aus LSP-Gal4/+; UAS-FussGFP/+ Larven (A-A'') und Proteinextrakt aus LSP-Gal4/+ Larven als Negativkontrolle wurden aufgetragen (B-B''). Tubulin (Stern) diente als Ladekontrolle. Fuss-GFP kann mit anti-GFP (Pfeil, A) in der Positivkontrolle detektiert werden. Anti-FussT1 (A', B') und anti-FussT2 (A'', B'') können neben unspezifischen Banden auch Fuss-GFP (A', A'', Pfeil) detektieren.

Als Ladekontrolle wurde anti-Tubulin verwendet. Als Positivkontrolle wurde Fuss-GFP (111kDa) mit Hilfe eines anti-GFP-Antikörpers zwischen der 80kDa und 175kDa Bande des Markers detektiert. Neben vielen unspezifischen Banden konnte mittels anti-FussT1 und anti-FussT2 ebenfalls Fuss-GFP detektiert werden. Aufgrund des starken Hintergrunds konnte endogen exprimiertes Fuss weder im Experiment noch in der Negativkontrolle detektiert werden (Abb. 25).

2.2.3 Detektion von Fuss in Embryonen und im larvalen Gehirn

Der Nachweis endogener Fussel-Expression in späten Embryonalstadien oder im zentralen Nervensystem von L3-Larven war beim Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen von anti-FussT1 bzw. anti-FussT2 nicht möglich. Dabei konnte keine spezifische Färbung, sondern nur eine starke Färbung des gesamten Gewebes erreicht werden. Da, wie im Immunoblot bereits sichtbar, ein Teil der erzeugten Antikörper neben Fussel auch andere Proteine detektiert, wurde mittels Präabsorption gegen 5h alte CantonS-Embryonen, die noch kein Fussel exprimieren, der Anteil unspezifisch bindender Antikörper in der anti-FussT2-Antikörperlösung verringert.

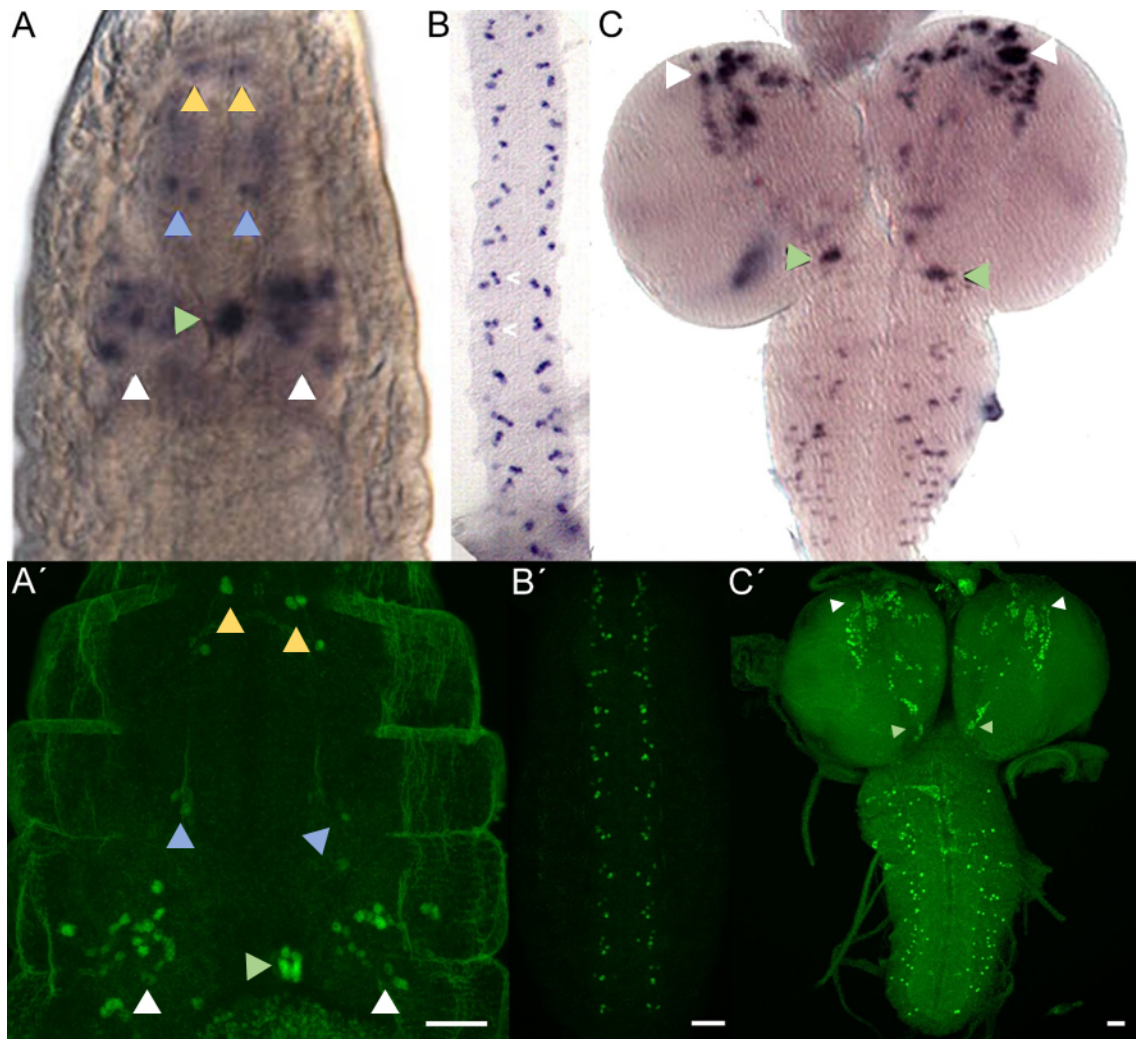


Abbildung 26: Vergleich des Fuss-Expressionsmusters der RNA-*in-situ*-Hybridisierung mit der Immunfluoreszenzfärbung mit anti-FussT2. Im embryonalen Gehirn zeigt die Antikörperfärbung mit antiFussT2 (A') das gleiche Muster wie die RNA-*in-situ*-Hybridisierung (A). Fussel-Expression kann in beiden Färbungen in Zellen im Gehirn (weißer Pfeil) vor dem Gehirn (blauer Pfeil), nahe des Pharynx (grüner Pfeil) und nahe der Spitze (gelber Pfeil) nachgewiesen werden. Im Strickleiternnervensystem ist auch in beiden Fällen ein sehr spezifisches, ähnliches Muster zu erkennen (B, B') und auch die Expression im larvalen Hirn ähnelt der RNA-*in-situ*-Hybridisierung (C, C'). Stacks. Die Balken entsprechen 25µm. (Modifizierte Abbildung nach Takaesu *et al.* 2012).

Auf diese Weise kann in Gehirnen (Abb. 26A') und im Strickleiternnervensystem (Abb. 26B') von 16h alten Embryonen sowie im zentralen Nervensystem (ZNS) von L3-Larven (Abb. 26C'), das bereits aus der RNA-*in-situ*-Hybridisierung (Abb. 26A - C) bekannte Muster mit Hilfe des präabsorbierten anti-FussT2-Antikörpers detektiert werden. Es zeigten sich bei der Färbung mit anti-FussT2 von larvalen Gehirnen Zellen, bei denen das Zytoplasma und Axone gefärbt sind. Hierbei handelt es sich um unspezifisch detektierte Antigene durch Antikörper, die bei der Präabsorption gegen 5h alte CantonS-Embryonen nicht ausreichend entfernt werden können (siehe Abb. 30). Somit kann präabsorbierter

anti-FussT2-Antikörper zum Nachweis der Fuss-Expression verwendet werden, solange nur Zellen betrachtet werden, die ausschließlich eine Kernfärbung aufweisen.

Die anti-FussT1-Antikörper wurden für die Verwendung im *Western Blot* und in der Immunfluoreszenz von Jan Polz (2014) optimiert. Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden nur die anti-FussT2-Antikörper zur Detektion von Fussel eingesetzt.

2.3 Analyse der Fuss-Mutante MI13731 und Erzeugung einer *fuss*-Gal4-Linie durch RMCE

Neben dem gegenwärtig zur Mutagenese häufig verwendeten Crispr/Cas9-System ermöglicht das unter 1.9 näher beschriebene MiMIC-*gene trap*-System die Transkriptionsinhibierung von Genen und die simultane Expression von GFP als Reporter unter Promotorkontrolle des inserierten Gens in *Drosophila melanogaster*. Weiter erlaubt der Austausch des inserierten GFPs durch *recombination mediated cassette exchange* (RMCE) mit jeglicher anderen Sequenz unter anderem die Erzeugung von Gal4-Linien oder *protein traps*.

Bei den MiMIC-Mutagenesescreens konnten zwei MiMIC-Insertionen im *fuss*-Lokus isoliert werden. Dabei handelt es sich um die Linien Mi13731 und Mi03207.

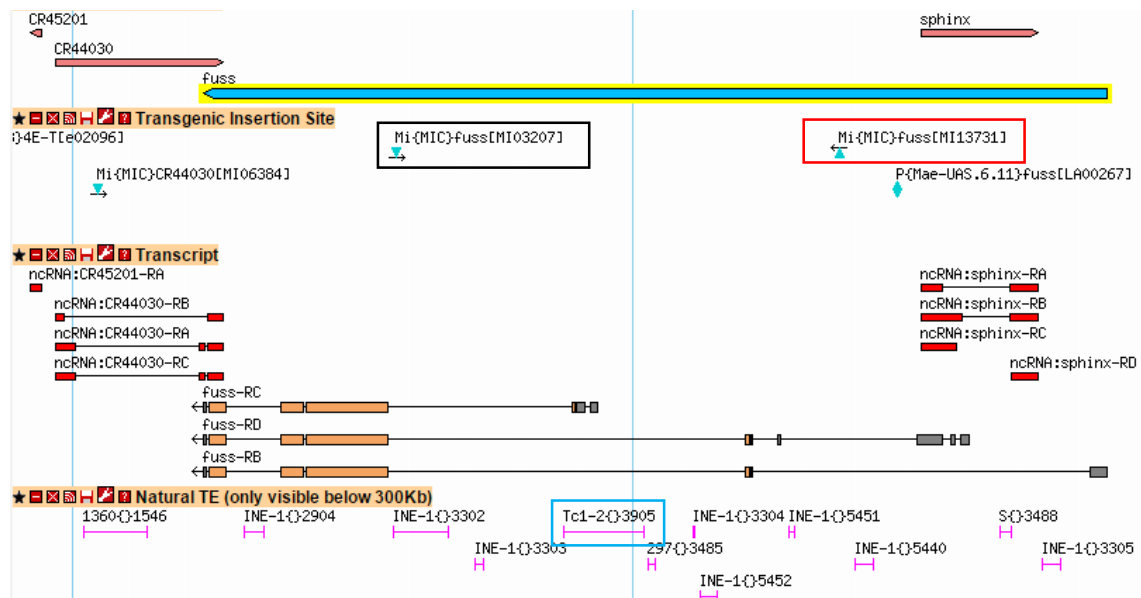


Abbildung 27: Lokalisation der MiMIC-Insertionen Mi03207 und Mi13731 im *fuss*-Genloкус. Mi13731 (rotes Rechteck) liegt in der gleichen Orientierung wie *fuss* in der 5'UTR von *fussB* und *fussD*. *fussC* ist nicht betroffen, wird aber nur basal transkribiert, da es aus der Insertion von TC1-2 {} 3905 (blaues Rechteck) hervorgegangen ist. Mi03207 (schwarzes Rechteck) liegt im Intron zwischen Exon1 und Exon2 aller Spleißformen, aber in entgegengesetzter Orientierung zu *fuss*.

Bei Mi13731 integrierte die MiMIC *gene trap*-Kassette in die 5'UTR der *fussB*- und *fussD*-Spleißform. *fussC* ist dagegen nicht betroffen. Dies sollte aber vernachlässigbar

sein, da *fussC* aufgrund der Transposoninsertion von Tc1-2 {} 3905 entstanden ist und nur *fussB* und *fussD* spezifisch exprimiert werden (Fischer *et al.*, 2012; Takaesu *et al.* 2012, Raß, 2012). Mi03207 integrierte dagegen in das Intron zwischen Exon1 und Exon2 aller Spleißformen, aber in der zum Gen entgegengesetzten Orientierung, wodurch es nicht zu einem Transkriptionsstop kommt (Abb. 27). Durch RMCE in der Mi13731-Linie könnte eine Gal4-Linie erzeugt werden, dagegen können durch RMCE in der Mi03207 alle drei Spleißformen mutiert werden, eine Gal4-Linie sowie eine *protein-trap* erzeugt werden.

Die Mi03207 Linie wurde von Matthias Schramm analysiert (2016). Nach der Inserierung einer *gene trap*-Kassette in der zu *fuss* gleichen Orientierung konnte aber mittels semiquantitativer qPCR gezeigt werden, dass *fuss* durch die *gene trap* in dieser Linie nur um 50% herunterreguliert wird und diese Linie für *loss-of-function*-Analysen daher nicht brauchbar ist. Deswegen wurde in dieser Arbeit ausschließlich mit der Mi13731-Linie gearbeitet.

2.3.1 Das ZNS homozygoter Mi13731-Larven weist weniger GFP-exprimierende Zellen auf

Da das MiMIC-Transposon in Mi13731 in der richtigen Orientierung inserierte, sollte dies zum Transkriptionsstop von *fussB* und *fussD* führen und gleichzeitig GFP unter Kontrolle des Fuss-Promotors exprimiert werden. Das GFP-Expressionsmuster im ZNS von homozygoten und heterozygoten Larven wurde daher verglichen.

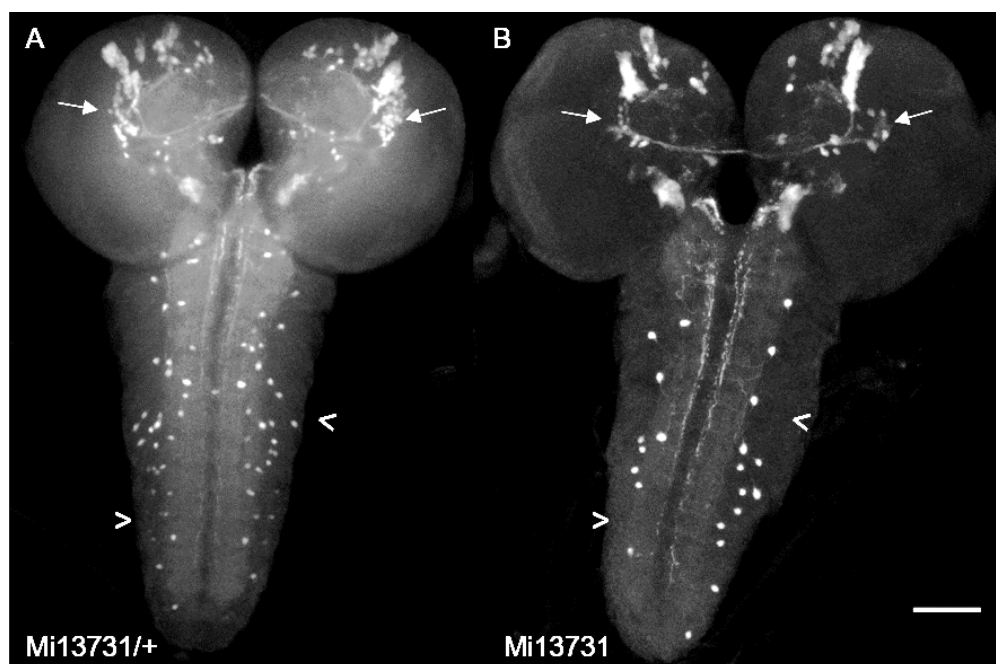


Abbildung 28: Das zentrale Nervensystem homozygoter Larven der Mi13731-Linie weist weniger GFP-positive Zellen auf als das heterozygoter Larven. Das GFP-Expressionsmuster in Larven des

Genotyps Mi13731/+ gleicht dem Fussel-Expressionsmuster (A). Beim Vergleich des ZNS heterozygoter Mi13731/+-Larven (A) mit dem ZNS von homozygoten Mi13731-Larven (B) ist erkennbar, dass ein spezieller GFP-Cluster in Gehirnen homozygoter Larven ausfällt (geschlossener Pfeil) und das Strickleiternnervensystem weniger GFP-exprimierende Zellen enthält als das in heterozygoten Larven (offener Pfeil). Stacks. Balken entspricht 50µm.

Das GFP-Expressionsmuster im ZNS von heterozygoten Larven ist vergleichbar mit dem Expressionsmuster von Fussel (Abb. 28A). Weiter kann festgestellt werden, dass homozygote Mi13731-Larven sowohl im Strickleiternnervensystem als auch in den Gehirnhemisphären weniger GFP-positive Zellen aufweisen als heterozygote Larven (Abb. 28B). Das gleiche kann bereits im sich entwickelnden Strickleiternnervensystem von Embryonen beobachtet werden (nicht gezeigt).

2.3.2 Mi13731 führt zu einer starken Herunterregulierung von *fussB* und *fussD*

Da das MiMIC-Transposon zur Inhibierung der *fussB* und *fussD* Transkription führen sollte, wurde überprüft, ob noch Transkript von *fussB* oder *fussD* vorhanden ist. Dies geschah mit Hilfe einer semiquantitativen qPCR und mit den speziellen Primern *fussB/D* qPCR fw und *fussB/D* qPCR rev, die nur *fussB* und *fussD* detektieren.

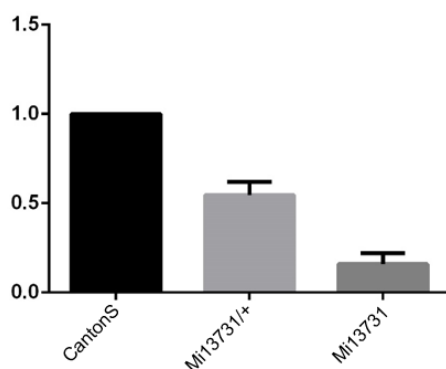


Abbildung 29: Vergleich der relativen Transkriptmengen von Fussel aus Kopfextrakten zwischen CantonS, heterozygoten Mi13731/+ und homozygoten Mi13731-Fliegen. Heterozygote Mi13731/+ Fliegen weisen 45% und homozygote Mi13731-Fliegen 85% weniger *fuss*-Transkript als CantonS-Fliegen auf.

Dabei zeigte sich, dass in der homozygoten Mi13731-Linie im Durchschnitt nur noch 15% *fuss*-Transkript im Gegensatz zu CantonS-Fliegen präsent ist. In heterozygoten Mi13731/+ Fliegen ist noch 55% *fuss*-Transkript vorhanden (Abb. 29).

2.3.3 In Gehirnen von homozygoten Mi13731-Larven kann keine Fussel-Expression detektiert werden

Eine wichtige Frage war, ob der anti-FussT2-Antikörper noch Fuss-Protein in homozygoten Mi13731-Larven detektieren kann und ob das GFP-Expressionsmuster im ZNS heterozygoter Mi13731/+ Larven wie erwartet dem Fuss-Expressionsmuster entspricht.

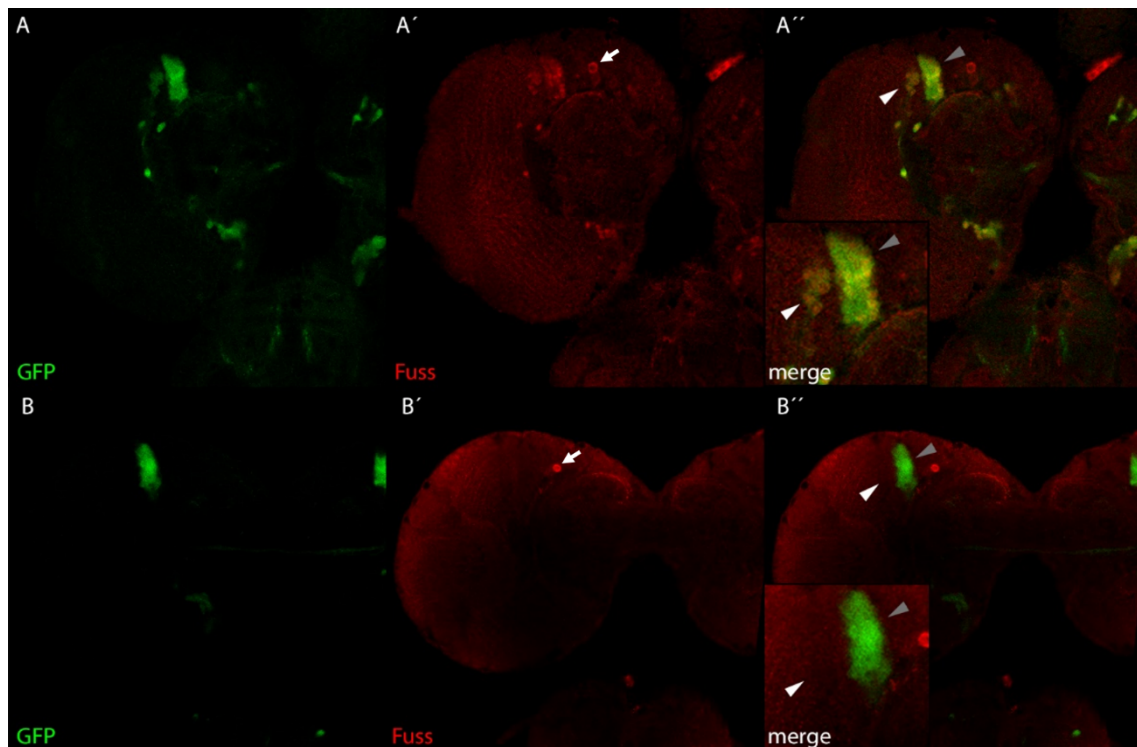


Abbildung 30: Analyse der Kolo-kalisation von Fuss und GFP in larvalen Gehirnen von heterozygoten oder homozygoten Mi13731-Larven. Fusselexpression (rot, B) überlappt mit der GFP-Expression (grün, A) in Gehirnen heterozygoter Mi13731/+ -Larven (graue Pfeilspitze, A''). Es kann keine Fussel-Expression in Gehirnen homozygoter Mi13731-Larven nachgewiesen werden (B'). Nur Färbung unspezifischer, zytoplasmatischer Antigene kann in Gehirnen homozygoter Mi13731-Larven beobachtet werden (weißer Pfeil, B'), die bereits in Gehirnen heterozygoter Mi13731/+ -Larven sichtbar ist (weißer Pfeil, A'). Die Anzahl GFP-exprimierender Zellen ist verringert (weiße Pfeilspitze, B''). Stacks.

Mit anti-FussT2 kann in Gehirnen von homozygoten L3-Larven kein Fuss wie in heterozygoten Gehirnen nachgewiesen werden (Abb. 30B - B'). In heterozygoten, larvalen Gehirnen stimmt zudem die Expression des inserierten GFPs mit dem von anti-FussT2 detektierten Expressionsmuster von Fuss überein (Abb. 30A - A''). Somit kann die heterozygote Mi13731/+ -Linie als Reporterlinie verwendet werden. Die homozygote Mi13731 weist im Schnitt 15% *fussB*- und *fussD*-Transkript auf und der anti-FussT2-Antikörper konnte in der Färbung kein Fuss mehr detektieren. Daher werden homozygote Mi13731-Fliegen in dieser Arbeit als Fuss-Mutante verwendet.

2.3.4 Erzeugung einer *fuss*-Gal4-Linie durch RMCE in der MiMIC-Linie Mi13731

Bisherige Versuche eine *fuss*-Gal4-Linie durch Klonieren von 2kb, 4kb oder 8kb großen Fragmenten vor dem Transkriptionsstart zu erzeugen, lieferten keine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen Gal4- und Fuss-Expressionsmuster, was auf den komplexen Genloкус von *fuss* zurückzuführen ist (Gruber, 2012; Polz, 2014; diese Arbeit). Da das GFP-Expressionsmuster der Mi13731-Linie mit dem von Fuss übereinstimmt, wurde das

Plasmid 1325 in 365 Embryonen des Genotyps *VasφC31*; *Mi13731* injiziert, um mittels RMCE das GFP mit Gal4 auszutauschen. Von den 365 Embryonen entwickelten sich 67 zu Larven und von diesen schlüpften 27 adulte Männchen und 22 Weibchen. Diese wurden dann zu Fliegen des Genotyps *yw*; *ey^D/Ci^D* gekreuzt und von den Kreuzungen konnten acht transformierte *yellow⁻*-Männchen isoliert werden. Aus diesen acht Männchen wurden acht *fuss*-Gal4-Stämme erzeugt. Stamm Nummer 3 wurde analysiert und in den Experimenten dieser Arbeit verwendet.

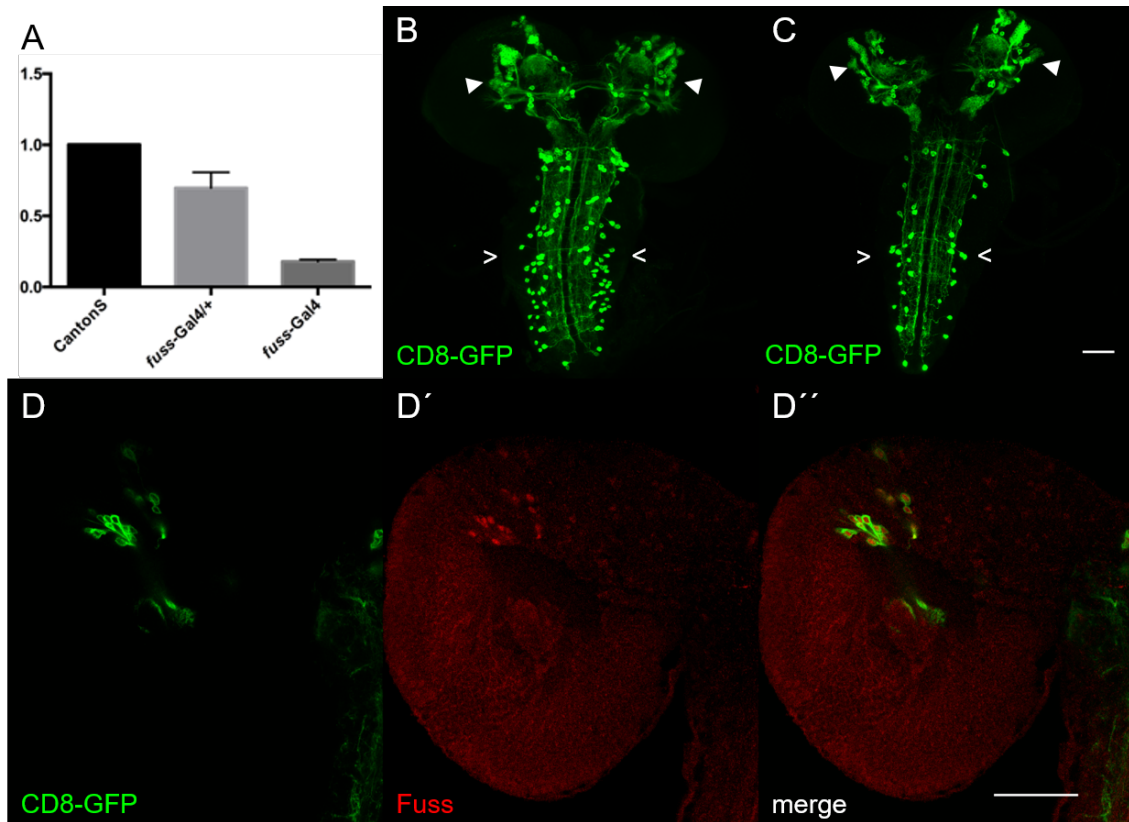


Abbildung 31: Charakterisierung der *fuss*-Gal4-Linie. Analyse der *fussB*- und *fussD*-Expression auf Transkriptionsebene mittels semiquantitativer qPCR zeigt, dass in Adulten der homozygoten *fuss*-Gal4-Linie im Gegensatz zu adulten CantonS-Fliegen durchschnittlich noch 18% *fuss*-Transkript vorhanden ist (A). Bei Gehirnen homozygoter *fuss*-Gal4-Fliegen (C) kann ein Verlust GFP-positiver Zellen im Vergleich zu heterozygoten *fuss*-Gal4/+ -Larven (B) beobachtet werden (Vergleich der Pfeile in B und C). Genotypen sind UAS-CD8-GFP; *fuss*-Gal4/+ und UAS-CD8-GFP; *fuss*-Gal4. Fuss-Expression (rot; D, D'') überlappt mit *fuss*-Gal4 exprimiertem UAS-CD8-GFP (grün; D, D'') und kann somit zur Manipulation oder Detektion der Fuss-Neurone verwendet werden. Stacks. Balken entsprechen 50µm.

Ähnlich wie bei der *Mi13731* Linie können im Gegensatz zu CantonS-Fliegen nur noch 18% *fuss*-Transkript in homozygoten *fuss*-Gal4-Fliegen detektiert werden (Abb. 31A). Die Expressionsmuster von Fuss und UAS-CD8-GFP stimmen überein (Abb. 31D - D'') und homozygote *fuss*-Gal4-Individuen (Abb. 31C) weisen weniger CD8-GFP-exprimierende Zellen auf als heterozygote Individuen (Abb. 31B). Dadurch kann auch

die Linie CD8-GFP; *fuss*-Gal4 heterozygot als Reporter und homozygot als Mutante in dieser Arbeit verwendet werden.

2.4 Expressionsanalyse von Fussel

Die bisher veröffentlichten Arbeiten beschränkten sich bei der Expressionsanalyse auf RNA-*in-situ*-Hybridisierungen. Dabei zeigte sich, dass die Expression von Fuss während der Entwicklung auf einzelne Zellen des Nervensystems beschränkt ist. Es wird außerdem angenommen, dass Fussel unter anderem in den Kenyonzellen, die den Pilzkörper bilden, exprimiert wird und für deren korrekte Entwicklung notwendig ist (Takaesu *et al.*, 2012).

Mit Hilfe der in dieser Arbeit erzeugten Antikörper, der *fuss*-Gal4-Linie und der erworbenen Reporterlinie sowie Mutante Mi13731 konnte die Identität und Abstammung Fuss-exprimierender Zellen genauer untersucht werden. Sofern nicht anders angegeben, wurden Embryonen, Larven oder adulte Fliegen des CantonS-Stamms verwendet.

2.4.1 Fussel ist in postmitotischen Neuronen exprimiert

Zuerst wurde das embryonale Expressionsmuster von Fuss untersucht, dabei konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Fuss-exprimierenden Zellen im ventralen Nervensystem (VNS) um Neurone und nicht Gliazellen handelt, da Fuss (Abb. 32A) ausschließlich mit Elav (Abb. 32C) und nicht mit Repo (Abb. 32B) kolokalisiert. Auch im embryonalen Gehirn ist Fuss in Neuronen exprimiert (nicht gezeigt). Im weiteren Verlauf werden Fuss-positive Neurone als Fuss-Neurone bezeichnet.

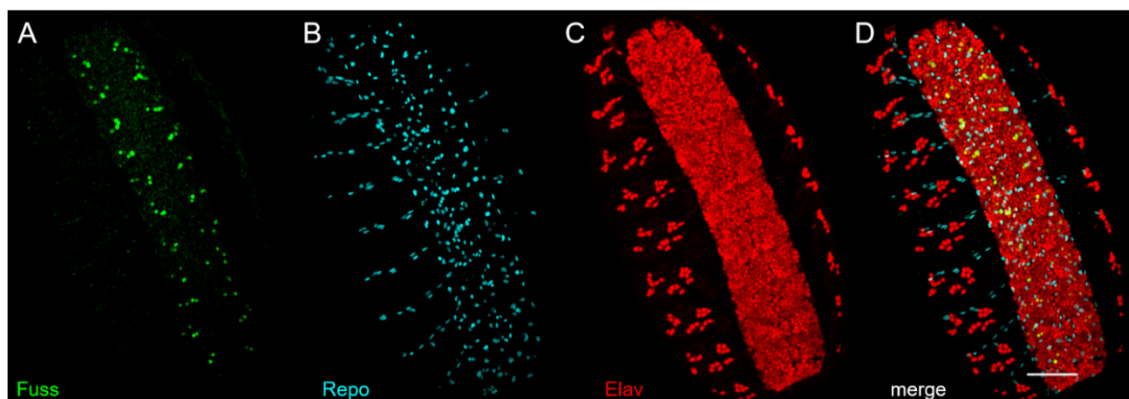


Abbildung 32: Fuss ist in Neuronen exprimiert. Fuss (A) kolokalisiert nicht mit Repo (B), sondern ausschließlich mit Elav (C) im VNS und ist somit in Neuronen exprimiert. Überlagerung der einzelnen Kanäle (D). Stacks. Balken entspricht 50µm.

Mit dem Marker Prospero (Pro) wurde überprüft, ob Fuss in Ganglionmutterzellen (GMZ) exprimiert wird oder nur in postmitotischen Neuronen zu finden ist. Zwischen Pro und Fuss kann aber keine überlappende Expression gefunden werden (Gelbes Signal kommt nicht durch Kolokalisation der Marker in der gleichen Zelle, sondern durch

Überlappung von Signalen aus unterschiedlichen Ebenen (Abb. 33A) zustande, wie die Lateralansicht (Abb. 33B) verdeutlicht). Auch aufgrund der Lage der Fuss-Neurone ist embryonal eine Expression in Neuroblasten auszuschließen (Abb. 33; persönliche Kommunikation mit Christof Rickert).

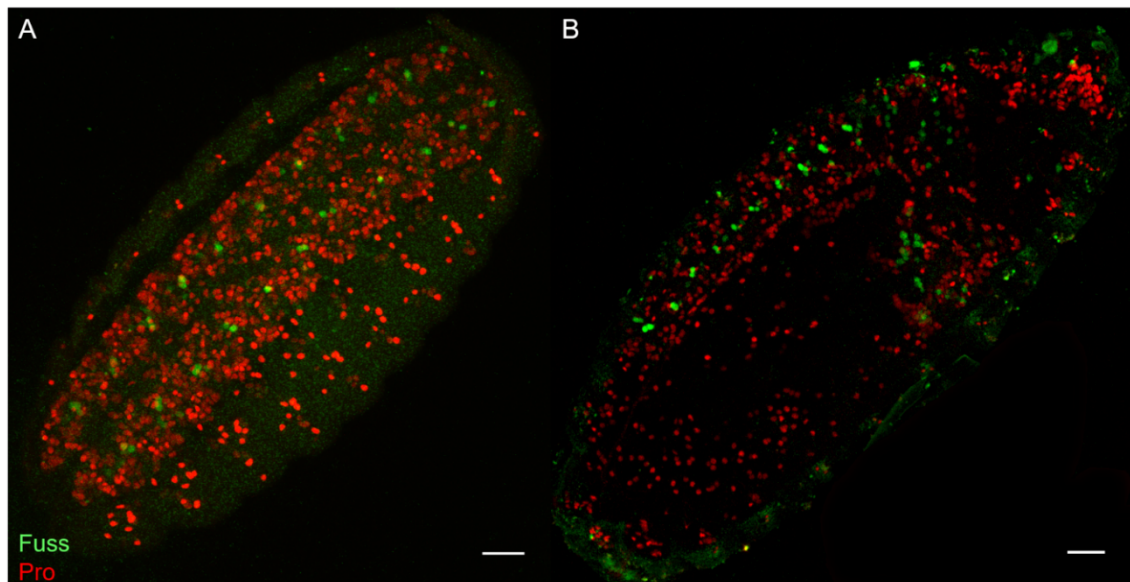


Abbildung 33: Fuss ist embryonal nicht in GMZ, sondern nur in postmitotischen Neuronen exprimiert. Keine Überlappung zwischen dem GMZ-Marker Prospero und Fuss kann in der Ventralansicht (A) bzw. Lateralansicht (B) festgestellt werden. Gelbes Signal ist die Folge von rotem und grünem Signal aus unterschiedlichen, fokalen Ebenen. Stacks. Balken entsprechen 25µm.

Zudem wurde auch in larvalen Gehirnen eine Doppelfärbung mit anti-FussT2 und anti-pHH3, durchgeführt, wobei aber keine Kolo-kalisation detektiert werden konnte (Abb. 34). Anti-pHH3 erkennt phosphoryliertes Histon H3 und wird deshalb als Mitosemarker verwendet.

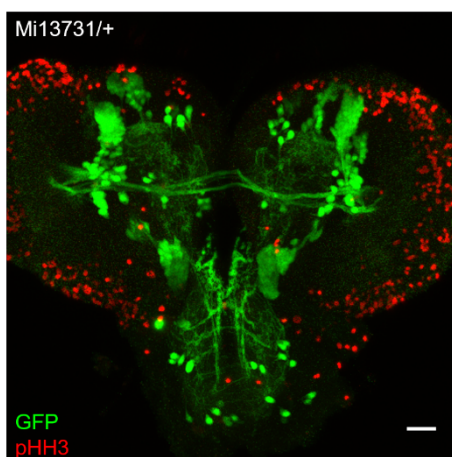


Abbildung 34: Fuss ist larval in postmitotischen Neuronen exprimiert. Es kann keine Kolo-kalisation zwischen GFP-exprimierenden Fuss-Neuronen (grün) und phosphoryliertem Histon H3 (rot), einem Mitosemarker, beobachtet werden. Überlappung kommt durch Signal aus unterschiedlichen fokalen Ebenen zustande. Stack. Balken entspricht 25µm.

Da während der Larvalphase weitere Fuss-Neurone entstehen, zeigt dies, dass Fuss sowohl embryonal als auch larval weder in Neuroblasten noch GMZ exprimiert wird, sondern dass die Expression auf postmitotische Neurone beschränkt ist.

2.4.2 Fussel ist in unterschiedlichen Interneurontypen exprimiert

Bei der Überexpression von Fussel mit dem ubiquitär exprimierenden Treiber *actin-Gal4* konnte festgestellt werden, dass die Transkriptmenge von *twin of eyeless (toy)* in späten Embryonalstadien im Gegensatz zur Kontrolle abnimmt (Zahn, 2013). Somit wurden die Expressionsmuster von Fuss und Toy verglichen, dabei zeigte sich, dass jeweils ein Fuss-Neuron pro Hemineuromer Toy exprimiert (Abb 35).

Dies ändert sich auch während der Entwicklung nicht, was suggeriert, dass Fuss Toy nicht grundlegend negativ reguliert, sondern dass die Herunterregulierung von Toy wohl durch die sehr frühe Überexpression von Fuss mit *actin-Gal4* während der Entwicklung zustande kam. Daneben können auch im embryonalen und larvalen Gehirn mehrfach Zellen beobachtet werden, die sowohl Toy als auch Fuss-positiv sind (nicht gezeigt).

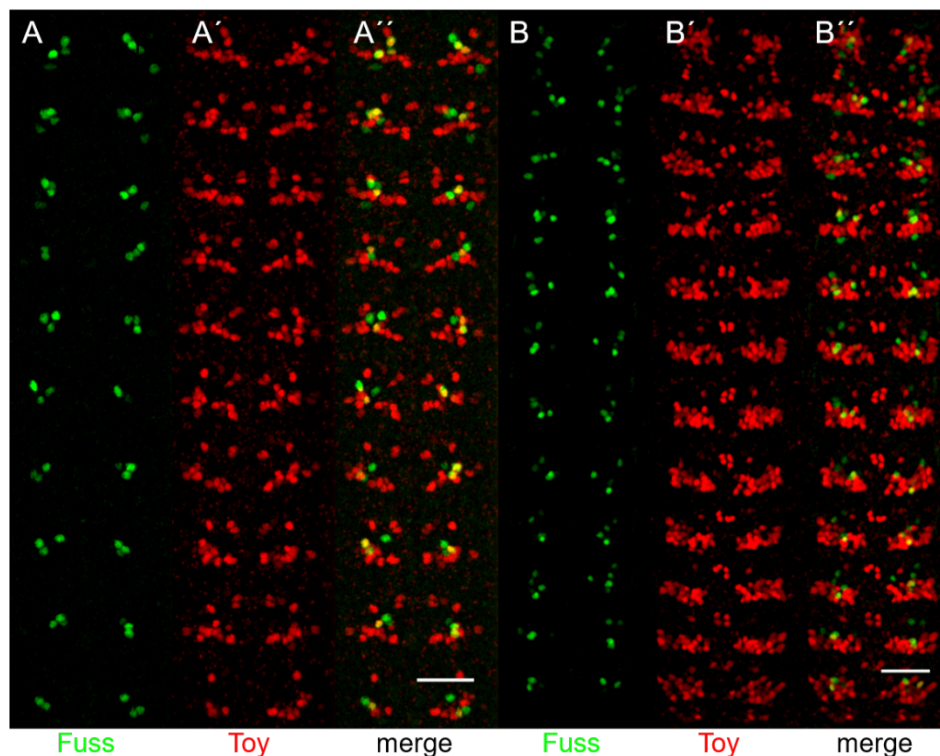


Abbildung 35: Pro Hemineuromer exprimiert ein Fuss-Neuron Toy. Im Embryonalstadium 14 (A - A'') befinden sich zwischen drei bis vier Fuss-Neurone in einem Hemineuromer (A). Ein Fuss-Neuron pro Hemineuromer ist jeweils Toy-positiv (A''). Im Embryonalstadium 16 (B - B'') ändert sich die Anzahl der Fuss-Neurone auf zwei bis sieben Neurone pro Hemineuromer (B). Die Anzahl Toy- und Fuss-koexprimierender Neurone bleibt konstant bei eins (B''). Die Anzahl der Fuss-Neurone nimmt immer von anterior (oben) nach posterior (unten) ab (A, B). Toy-Expression im VNS im Embryonalstadium 14 (A') und 16 (B'). Stacks. Balken entsprechen 25μm.

Wie bereits gezeigt, kann Fuss-Expression ab dem Abdominalsegment A8 beobachtet werden und die Anzahl der Fuss-Neurone im Strickleiternnervensystem nimmt während

der Embryonalentwicklung zu. So steigt die Anzahl von ein bis zwei Neurone auf bis zu sieben Neurone pro Hemineuromer. Die Anzahl der Fuss-Neurone nimmt zudem in den Hemineuromeren von posterior nach anterior zu (Abb. 35A, B).

Um mehr über die Zellidentität zu erfahren wurde die Expression von Dachshund (Dac) und Apterous (Ap), welche als Marker für Interneurone dienen, analysiert. Dac kolokalisiert im embryonalen Strickleiternervensystem mit Fuss in bis zu zwei Neuronen pro Hemineuromer (Abb. 36D, D') und somit handelt es sich bei einem Teil der Fuss-Neurone um Interneurone.

Die genaue Verteilung von Toy und Dac in einem aus fünf Neuronen bestehenden Fussel-Cluster wurde näher untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass Fuss-Neurone nicht simultan Toy und Dac exprimieren (Abb. 36D, D'). Dies konnte auch im embryonalen Gehirn beobachtet werden (nicht gezeigt).

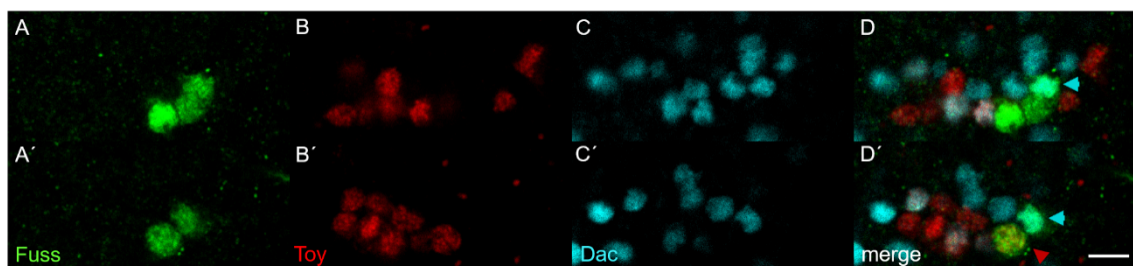


Abbildung 36: Toy und Dac werden in einem Fuss-Neuron nie koexprimiert. Fuss (A, A'), Toy (B, B') und Dac (C, C') kolokalisieren nie gleichzeitig in einem Neuron. Jeweils ein Fuss-Neuron weist Toy-Expression auf (D', rote Pfeilspitze), während zwei Fuss-Neurone Dac exprimieren (D, D', blaue Pfeilspitze). Einzelne Toy-Neurone, die Fuss nicht exprimieren, sind Dac-positiv (D, D'). Stacks. Balken entspricht 5µm.

Bei Embryonen des Genotyps *ap-LacZ/+* kann LacZ-Färbung anfangs in einem (Abb. 37) und später in zwei (nicht gezeigt) Fuss-Neuronen pro Hemineuromer beobachtet werden. Bei dem zuerst sichtbaren Neuron, das sowohl Fuss und Ap exprimiert, handelt es sich um das Toy-exprimierende Fuss-Neuron. Die Ap-Neurone werden in den Hemineuromeren in ein dorsales, zwei ventrale und in die vier thorakalspezifischen Ap-Neurone unterteilt. Nur die ventralen Ap-Neurone exprimieren Fuss.

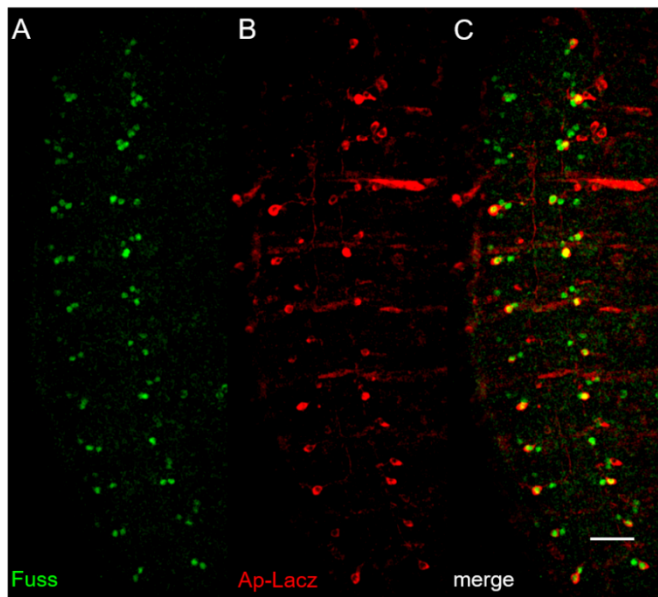


Abbildung 37: Fuss kolokalisiert partiell mit Apterous. Embryonen, die einen *LacZ enhancer trap* unter Kontrolle des *ap*-Promotors besitzen, zeigen Kolokalisation (C) zwischen *LacZ* (B) und *Fuss* (A) in einem Neuron pro Hemineuromer. Genotyp der Embryonen ist *ap-LacZ/+*. Stacks. Balken entspricht 25µm.

Weitere Marker, die neben der Zellidentität auch die Abstammung von *Fuss*-Neuronen klären sollten, zeigen keine Kolokalisation mit *Fuss*. Dazu gehören *Wingless*, *Engrailed*, *Even Skipped*, *Mirror*, *Krüppel* und *Eyes absent*. *Gooseberry* und *Hedgehog* zeigen nur partielle Kolokalisation mit *Fuss* in jeweils einem Neuron in den thorakalen Hemineuromeren (nicht gezeigt).

2.4.3 *Fuss*-Neurone schütten unterschiedliche Neurotransmitter aus

Im murinen System ist das *Fuss*-Homolog *Corl2* unter anderem spezifisch in Purkinjezellen des Kleinhirns exprimiert und wird für deren korrekte Differenzierung benötigt. Purkinjezellen senden zudem den Neurotransmitter GABA aus (Wang *et al.*, 2011; Nakatani 2014). Zwar gibt es keinen vergleichbaren Nervenzelltyp in *Drosophila melanogaster*, dennoch wurde mittels spezifischer Treiberlinien überprüft, welchen Neurotransmitter *Fuss*-Neurone exprimieren.

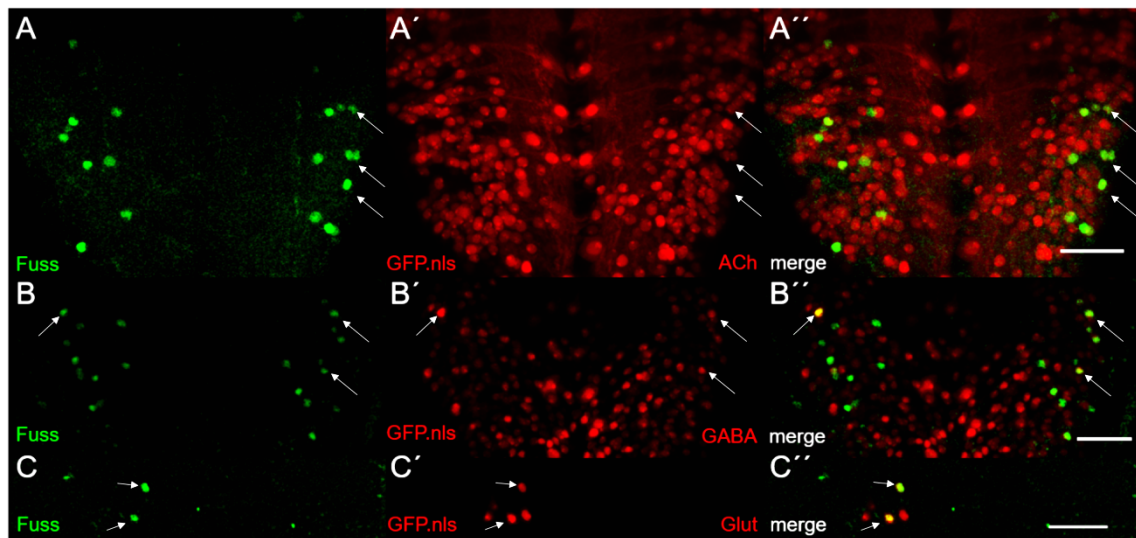


Abbildung 38: Fuss-Neurone schütten Acetylcholin, GABA und Glutamat aus. Fuss-Expression (A, B) überlappt partiell im larvalen VNS mit dem GFP-Expressionsmuster der Treiberlinie *ChAT-Gal4*, die cholinerge Neurone (A', A'') markiert und mit dem GFP-Expressionsmuster der Treiberlinie *Gad1-Gal4* die gabaerge Neurone (B', B'') markiert. Im larvalen Gehirn können glutamaterge Neurone (C'), die mit *Ok371-Gal4* analysiert wurden, beobachtet werden, die Fuss-positiv sind (C, C''). Genotypen der Larven sind *ChAT-Gal4/UAS-GFP.nls* (A – A''), *Gad1-Gal4/UAS-GFP.nls* (B – B'') und *Ok371-Gal4/UAS-GFP.nls* (C – C''). Pfeile weisen auf vereinzelte Kolokalisationen mit Fuss hin. ACh = cholinerge Neurone. GABA = GABAerge Neurone. Glut = glutamaterge Neurone. Stacks. Balken entsprechen 25µm.

Dabei konnte gezeigt werden, dass ein großer Anteil Fuss-exprimierender Neurone im Strickleiternnervensystem cholinerg (*ChAT-Gal4*; Abb. 38A – A'') und GABAerg (*Gad1-Gal4*; Abb. 38B – B'') ist. Im VNS lassen sich keine Fuss-Neurone finden, die Glutamat (*OK371-Gal4*) als Neurotransmitter nutzen. Lediglich drei glutamaterge (Abb. 38C – C''), drei GABAerge (nicht gezeigt) und ungefähr zwanzig cholinerge (nicht gezeigt) Fuss-Neurone können je Gehirnhemisphäre beobachtet werden. Einem Großteil der in den Gehirnhemisphären lokalisierten Fuss-Neurone konnte aber kein Neurotransmitter zugeordnet werden. Ebenfalls konnte keine Kolokalisation von Fuss mit den Neurotransmittern Octopamin (*Tdc2-Gal4*), Serotonin (*Ddc-Gal4*), Dopamin (anti-Th) oder peptidergen Neuronen (*Dimm-Gal4*) festgestellt werden (nicht gezeigt). Da bis auf die Analyse der Kolokalisation mit Dopamin ausschließlich Gal4-Linien verwendet wurden, kann die fehlende Kolokalisation dadurch entstehen, dass die Gal4-Linien nicht alle Zellen abdecken oder andere Neurotransmitter exprimieren, die nicht getestet werden konnten.

2.4.4 Fuss ist außerhalb des ZNS auch in sensorischen Neuronen exprimiert

Wie bereits bei der Analyse der embryonalen Expression von Fuss gezeigt, wird Fuss nicht nur im zentralen Nervensystem exprimiert. Fuss-Expression kann auch in einem Teil der Neurone des Hypozerebralganglions (HCG) und des Proventrikularganglions (PVG) beobachtet werden. Zellkörper weiterer Fuss-Neurone sitzen wahrscheinlich im posterioren pharyngalen Sinnesorgan (PPS), dorsalen pharyngalen Organ (DPO) und im dorsalen pharyngalen Sinnesorgan (DPSO), wobei eine genauere Lagebestimmung dieser Neurone weitere Analysen voraussetzt. Somit sind Fuss-Neurone außerhalb des ZNS in Teilen des larvalen, stomatogastrischen Nervensystems (HCG und PVG) und des larvalen Geschmackssystems exprimiert (Abb. 39). Interessanterweise finden sich neben Fuss-exprimierenden Interneuronen auch Fuss-exprimierende sensorische Neurone, die den Mitteldarm, den Proventrikulus (Abb. 39B) sowie den Pharynx (Abb. 39A') innervieren. Diese im Pharynx gelegenen gustatorischen Neurone dienen unter anderem dazu, zuckerhaltige Nahrung zu erkennen und Giftstoffe zu vermeiden (Apostolopoulou *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2016). Dagegen wird angenommen, dass die im Proventrikularganglion gelegenen sensorischen Neurone z. B. den Fruktosegehalt der Nahrung messen und so das Fressverhalten regulieren (Miyamoto *et al.*, 2012).

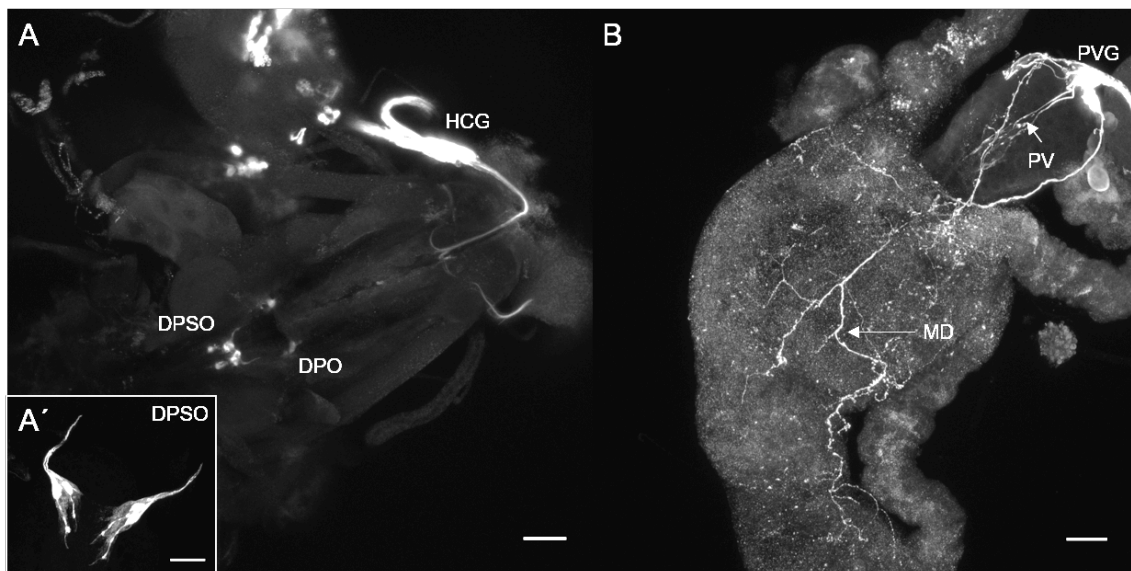


Abbildung 39: Fuss-Expression im larvalen, stomatogastrischen Nervensystem und im larvalen Geschmackssystem. CD8-GFP wird im Hypozerebralganglion (A, HCG) und Proventrikularganglion (B, PVG) des stomatogastrischen Nervensystems exprimiert. Ebenfalls kann Expression im dorsalen, pharyngalen Organ (A, DPO) und im dorsalen pharyngalen Sinnesorgan (A', B, DPSO) beobachtet werden. Sensorische Fuss-Neurone innervieren den Proventrikulus (PV) und den Mitteldarm (MD). Der verwendete Genotyp ist UAS-CD8-GFP; *fuss*-Gal4/+ . Stacks. Balken entsprechen 50µm (A, B) bzw. 25µm (A').

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Fuss-Neurone zu heterogenen Populationen von Neuronen gehören. Es konnte kein neuronaler Marker identifiziert werden, der in allen Fuss-Neuronen exprimiert ist. Auch exprimieren die Fuss-Neurone mindestens drei unterschiedliche Neurotransmitter, Acetylcholin, GABA oder Glutamat. Die verwendeten Marker konnten aber auflösen, dass Fuss wie im murinen System in postmitotischen Neuronen exprimiert wird und dass es sich bei den im ZNS lokalisierten Fuss-Neuronen um Interneurone und nicht Motoneurone (siehe auch Abb. 45) handelt.

Außerhalb des ZNS wird Fuss in Neuronen des Geschmackssystems und SNS exprimiert. Dort ist Fuss nicht nur in Interneuronen, sondern auch in sensorischen Neuronen zu finden.

2.5 Funktionsanalyse von Fussel

Bei vorhergehenden Experimenten wurde hauptsächlich versucht mit Überexpressionen von Fuss in verschiedenen Geweben und anschließenden Immunfluoreszenzfärbungen, semiquantitativen qPCRs, RNAseqs oder ChIPseqs die molekulare Funktion und Zielgene von Fuss zu identifizieren (Kullmann, 2014; Irlbeck, 2014; Raß, 2012; Zahn, 2013).

Dagegen haben Takaesu *et al.* (2012) eine Defizienz erzeugt, mit Hilfe derer sie die endogene Funktion von Fuss genauer untersuchen konnten. Diese Defizienz betrifft jedoch neben Fuss auch noch andere Gene, weshalb die Spezifität der mutanten Effekte möglicherweise auch anderen Genen zugeordnet werden kann. Mit der in dieser Arbeit charakterisierten Mutante Mi13731 und der daraus erzeugten *fuss*-Gal4-Linie wurde versucht, die bisherigen Ergebnisse zu verifizieren, um die Funktion von Fuss besser zu verstehen.

2.5.1 Verlust der GFP-Expression in der homozygoten Mi13731-Linie ist nicht die Folge von Zelltod

Bei der Analyse, ob die Mi13731-Linie als Reporterlinie für Fuss geeignet ist, zeigte sich beim Vergleich von Gehirnen homozygoter und heterozygoter Mi13731-Larven, dass die Anzahl GFP-exprimierender Zellen in Gehirnen homozygoter Larven reduziert war. Besonders deutlich war dieser Effekt im Strickleiternnervensystem. Dies könnte auf möglichen Zelltod durch den Verlust von Fussel zurückzuführen sein.

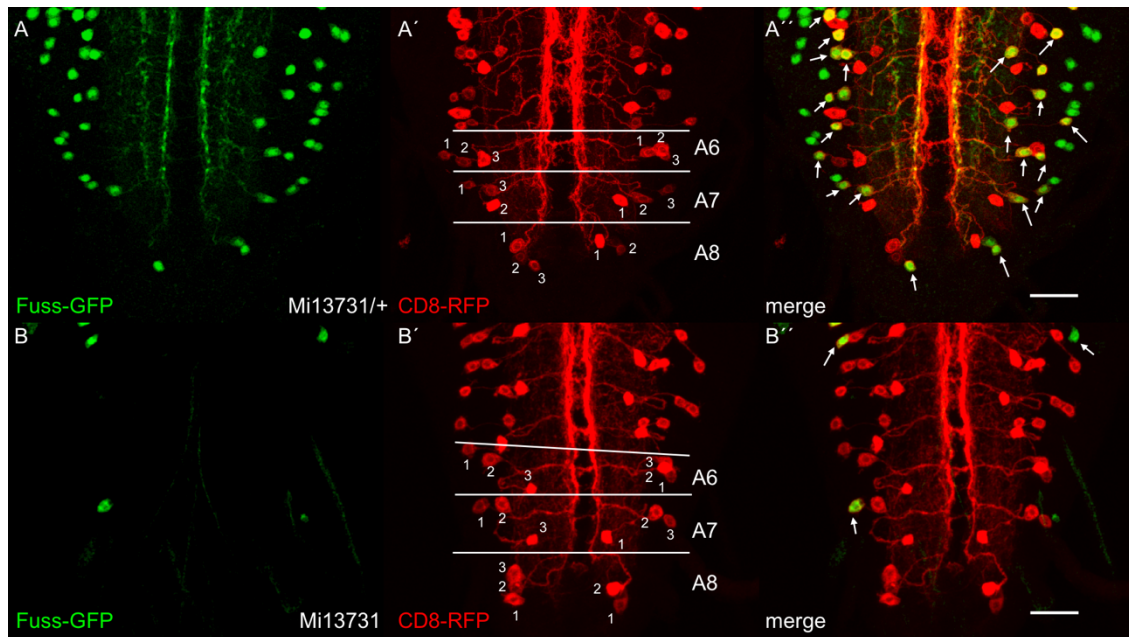


Abbildung 40: Verlust der Fuss-Expression führt nicht zu Zelltod. GFP-Expression (A, A'') der Fuss-Neurone kann in den zwei ventralen Ap-Neuronen (A'', Pfeile) pro Hemineuromer im VNS von heterozygoten Mi13731/+ -Larven nachgewiesen werden. Im VNS von homozygoten Mi13731-Larven geht ein Großteil der GFP-Expression (B, B'') verloren, während es anscheinend keine Veränderung des Ap-Musters (B', B'') gibt. Einzelne Fuss-Neurone exprimieren weiterhin GFP (B'', Pfeile). Ein Vergleich zwischen den letzten drei Fuss-exprimierenden Abdominalsegmenten A6 - A8 im VNS von heterozygoten (A') und homozygoten (B') Mi13731-Larven zeigt, dass zwar die GFP-Expression verloren geht, dies aber nicht auf den Verlust Ap-positiver Neurone zurückzuführen ist, da deren Anzahl unverändert bleibt. Die verwendeten Genotyp sind *ap-Gal4/+; CD8-RFP/+; Mi13731/+* (A - A'') und *ap-Gal4/+; CD8-RFP/+; Mi13731* (B - B''). Stacks. Die Balken entsprechen 25µm.

Da Fussel in den ventralen Ap-Neuronen exprimiert wird, wurde die Präsenz dieser Neurone in der homozygoten Mi13731-Linie überprüft. Dabei kann kein Verlust Ap-positiver Neurone beobachtet werden. Ausserdem verlieren nicht alle ventralen Ap-Neurone die GFP-Expression und einzelne Neurone in einem Hemineuromer exprimieren GFP während im gegenüberliegenden Hemineuromer keine GFP-Expression mehr sichtbar ist. Das bedeutet, dass das fehlende GFP-Signal nicht von Zelltod durch den Verlust von Fuss ausgelöst wird, sondern dass eine hypothetische, positive Rückkopplungsschleife von Fuss nicht mehr erzeugt werden kann. Weiter scheint Fuss

in unterschiedlichen Zellen bzw. Zellgruppen unterschiedlich reguliert zu werden, weil das GFP-Signal nicht komplett verloren geht (Abb. 40). Ob Unterschiede im Projektionsmuster der Ap-Neurone im VNS auf den Verlust der Fuss-Expression oder auf die Präparation zurückzuführen sind, sind eingehendere Analysen notwendig.

2.5.2 Fussel wird nicht für die korrekte Differenzierung des Pilzkörpers benötigt

Takaesu *et al.* (2012) haben aufgrund von RNA-*in-situ*-Hybridisierungen im Gehirn von L3-Larven angenommen, dass Fuss in Kenyonzellen exprimiert wird. Da dieses Zell-Cluster im larvalen Gehirn leicht abzugrenzen ist, wurde dies mit Hilfe des anti-FussT2-Antikörpers überprüft. Dazu wurde kernlokalisierendes GFP.nls mit der Treiberlinie *OK107-Gal4* exprimiert. Diese Treiberlinie ist bereits in den pilzkörperspezifischen Neuroblasten aktiv und exprimiert auch stark in den Kenyonzellen, somit konnten diese Zellen markiert werden (Abb. 41A; Stern). Als weiterer Marker wurde der Kernrezeptor Ecdyson-Rezeptor 1B (EcR1B) verwendet, da dieser unter anderem in Kenyonzellen exprimiert wird (Abb. 41B; Stern). Überraschenderweise kann keine Kolo-kalisation zwischen Kenyonzellen und Fuss festgestellt werden (Abb. 41D). Einige Fuss-Neurone zeigen zwar EcR1B-Expression, diese Neurone liegen aber außerhalb der Kenyonzell-domäne (Abb. 41C, D; Stern). Damit kann eine Lokalisation von Fuss in den Kenyonzellen ausgeschlossen werden.

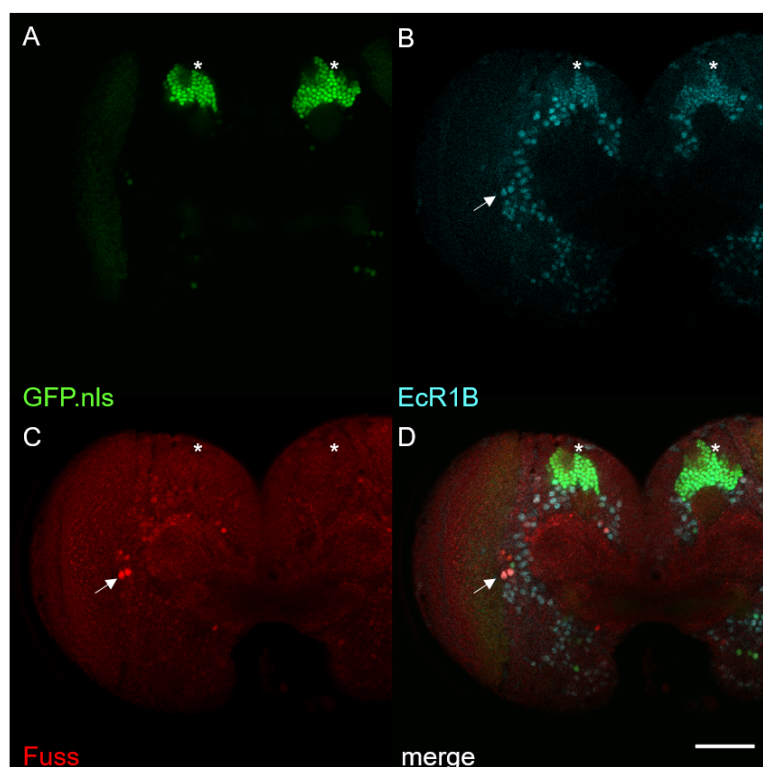


Abbildung 41: Fussel ist nicht in Kenyonzellen exprimiert. Die Kenyonzellen und deren Neuroblasten wurden durch eine Expression von kernlokalisiertem GFP.nls mit der Treiberlinie *OK107-Gal4* markiert (A, Stern). Die Kenyonzellen (B, Stern) und weitere Zellen exprimieren im späten L3-Larvenstadium EcR1B (B). Fuss ist nicht in den Kenyonzellen exprimiert (C), einzelne Fuss Neurone weisen aber EcR1B-Expression auf (D, Pfeil). Der verwendete Genotyp ist *UAS-GFP.nls/+; OK107-Gal4/+*. Einzelaufnahmen. Der Balken entspricht 50µm.

Takaesu *et al.* erzeugten eine Defizienz *Df(4)dCORL*, bei der unter anderem *fuss* deletiert ist. Da die Defizienz *Df(4)dCORL* nicht zur Verfügung stand, da diese in keinem *stock center* erhältlich ist, wurde versucht die von ihnen beschriebenen Phänotypen mit Hilfe der Mi13731-Linie oder Ablation der Fuss-positiven Zellen durch Reaper zu replizieren. Die Defizienz *Df(4)dCORL* weist während der Entwicklung eine erhöhte Letalität auf, dagegen kann bei homozygoten Mi13731-Fliegen keine erhöhte Letalität beobachtet werden. Bei adulten *Df(4)dCORL*-Fliegen ist die Lebensspanne stark verkürzt, aber auch die Analyse der Lebensspanne von homozygoten Mi13731-Männchen im Vergleich zu heterozygoten Mi13731/+ -Männchen zeigt keine signifikante Verringerung der Lebensspanne (Abb. 42). Bei Fliegen, bei denen die Fuss-positiven Zellen durch die Expression von UAS-Reaper mit der *fuss*-Gal4-Linie entfernt wurden, kann auch keine erhöhte Letalität während der Entwicklung festgestellt werden. Folglich ist Fuss nicht essentiell für die Entwicklung und ein Verlust von Fuss hat keinen Einfluss auf die Lebensspanne. Ebenso sind Fuss-exprimierende Zellen selbst nicht notwendig für ein Überleben während der Entwicklung.

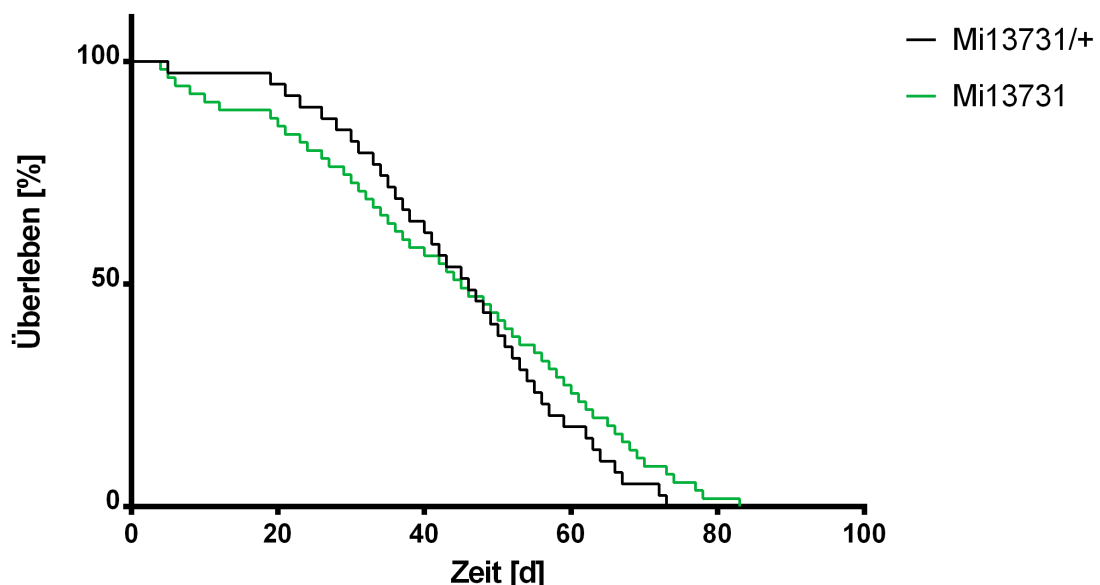


Abbildung 42: Keine verringerte Lebensdauer bei homozygoten Mi13731-Fliegen. Bei homozygoten, adulten Mi13731-Männchen (grün) gibt es keine erhöhte Letalität im Vergleich zu heterozygoten Mi13731/+ -Männchen (schwarz). 50% der Individuen sind bei homozygoten Mi13731-Männchen nach 45 Tagen und bei heterozygoten nach 46 Tagen gestorben.

Weiter wurde die EcR1B-Expression in den Kenyonzellen von späten L3-Larven untersucht, da die Expression von EcR1B in Kenyonzellen von *Df(4)dCORL* ausblieb. Dabei zeigen Gehirne von homozygoten Mi13731-Larven das charakteristische EcR1B-Expressionsmuster in den Kenyonzellen (Abb. 43B) wie in den heterozygoten

Mi13731/+-Kontrolllarven (Abb. 43A). Ebenso hat der Verlust von Fuss-Neuronen durch die Expression von Reaper mit der *fuss*-Gal4-Linie keinen Einfluss auf das Expressionsmuster von EcR1B in den Kenyonzellen (Abb. 43D).

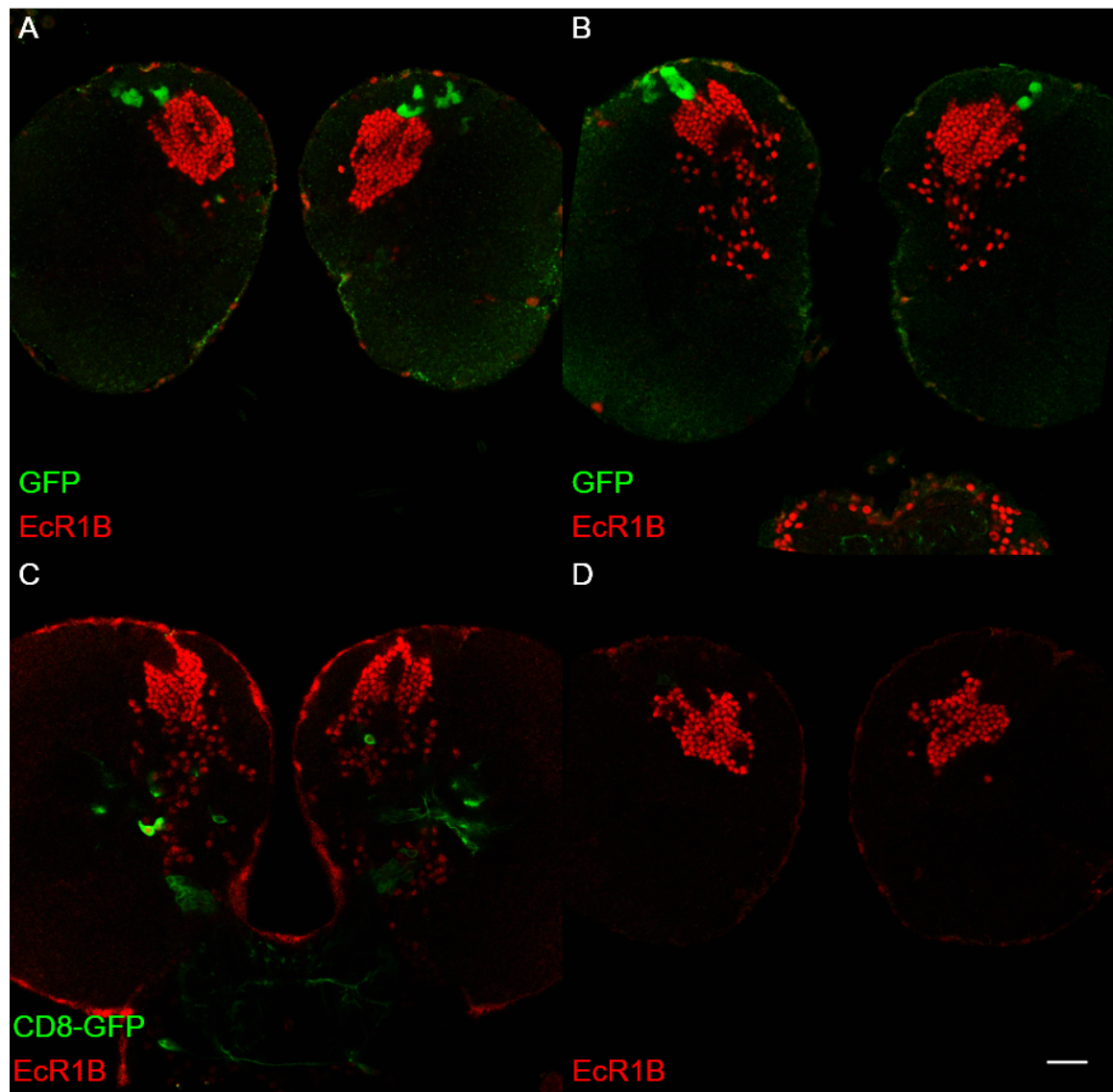


Abbildung 43: EcR1B wird nicht durch Fuss oder Fuss-Neurone beeinflusst. GFP-exprimierende Fuss-Neurone sind neben den EcR1B-exprimierenden Kenyonzellen lokalisiert (A). Ein Fehlen der Fuss-Expression hat keinen Einfluss auf die EcR1B-Expression in Gehirnen von Fuss-mutanten Mi13731-Larven (B). Während die Kontrolle GFP exprimiert, kann aufgrund der Ablation der GFP-positiven Zellen keine GFP-Expression mehr gefunden werden. Ein Fehlen der Fuss-Neurone beeinträchtigt die EcR1B-Expression in den Kenyonzellen nicht. Die verwendeten Genotypen sind Mi13731/+ (A), Mi13731 (B), UAS-CD8-GFP; *fuss*-Gal4/+ (C) und UAS-CD8-GFP/+; UAS-RPR/+; *fuss*-Gal4/+ (D). Einzelbildaufnahmen. Der Balken entspricht 25µm.

Die adulten Pilzkörper der defizienten Fliegenlinie *Df(4)dCORL* waren stark deformiert, so fehlten z.B. ein β -Lobus und die β -Loben waren fusioniert (Takaesu *et al.*, 2012). Als Marker für die α -, β - und γ -Loben des Pilzkörpers wurde FasciclinII (FasII) verwendet. Die Pilzkörper von Fliegen bei denen die Fuss-Neurone ablatiert wurden (Abb. 44D) oder

von homozygoten Mi13731-Linie (Abb. 44B) sind dagegen wildtypisch ausgebildet (Abb. 44A, C).

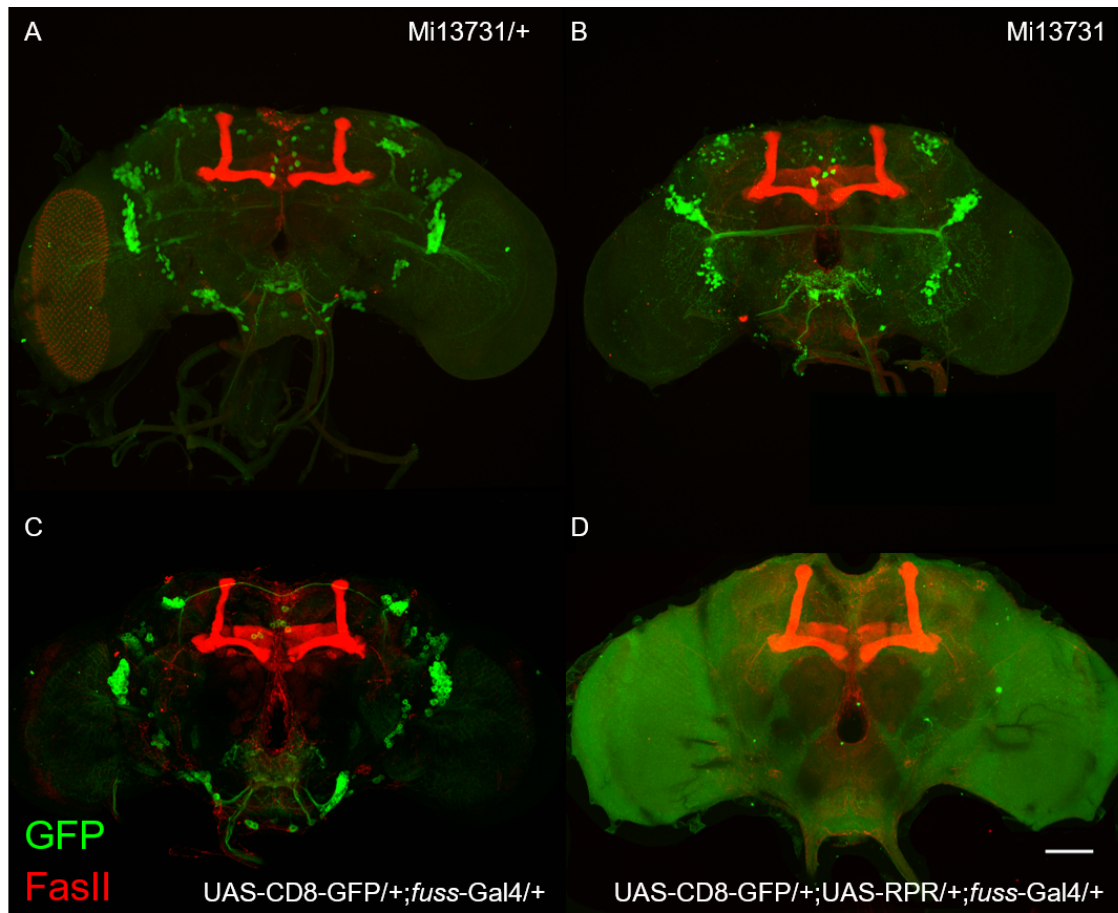


Abbildung 44: Fuss-Expression oder Fuss-Neurone sind nicht für eine korrekte Pilzkörperentwicklung notwendig. Die α -, β - und γ -Loben des Pilzkörpers wurden mit einem Antikörper gegen FasII markiert. Im Vergleich zu Pilzkörpern heterozygoter Mi13731/+ Fliegen (A) weisen Pilzkörper homozygoter Mi13731 Fliegen (B) keine Defekte auf. Während die Kontrolle (C) GFP exprimiert, kann aufgrund der Ablation der GFP-positiven Zellen (D) keine GFP-Expression mehr gefunden werden. Die Ablation der Fuss-Neurone führt zu keiner Beeinträchtigung der adulten Pilzkörper (D). Die verwendeten Genotypen sind Mi13731/+ (A), Mi13731 (B), UAS-CD8-GFP; *fuss*-Gal4/+ (C) und UAS-CD8-GFP/+; UAS-RPR/+; *fuss*-Gal4/+ (D). Stacks. Der Balken entspricht 50µm.

Keiner der von Takaesu *et al.* (2012) beschriebenen Phänotypen, die aus einem Verlust der Fuss-Expression resultieren sollten, konnte mit Fliegen der homozygoten Mi13731-Linie oder mit Fliegen, bei denen die Fuss-Zellen ablatiert wurden, repliziert werden. Weder weisen diese Fliegen eine verringerte Überlebenswahrscheinlichkeit während der Entwicklung oder eine verkürzte Lebensspanne auf noch ist der Pilzkörper deformiert.

2.5.3 Fussel ist endogen nicht am Dpp-Signalweg beteiligt

Frühere Studien haben gezeigt, dass eine Überexpression von Fuss zu einer Inhibierung des Dpp-Signalwegs führt, wenn diese Überexpression in Zellen stattfindet, in denen dieser Signalweg aktiv ist (Fischer *et al.* 2012; Raß, 2012).

Es stellt sich jedoch die Frage, ob Fuss auch endogen in den Dpp-Signalweg eingreift. Ein interessantes Ergebnis erbrachte daher auch die Doppelfärbung von Fuss und phosphoryliertem Mad (pMad). pMad ist zum einen ein Marker für Motoneurone oder Tv-Neurone und zum anderen ein Marker für einen aktiven Dpp-Signalweg (Allan *et al.*, 2003; Marqués *et al.*, 2002). Es kann aber keine Kolo­kalisation zwischen Fuss und pMad im Gehirn (Abb. 45A) und VNS (Abb. 45B) beobachtet werden. Weiter lässt die fehlende Kolo­kalisation mit pMad und die bereits gezeigte Kolo­kalisation mit Interneuronenmarkern darauf schließen, dass Fuss-Neurone im zentralen Nervensystem ausschließlich Interneurone und keine Motoneurone sind.

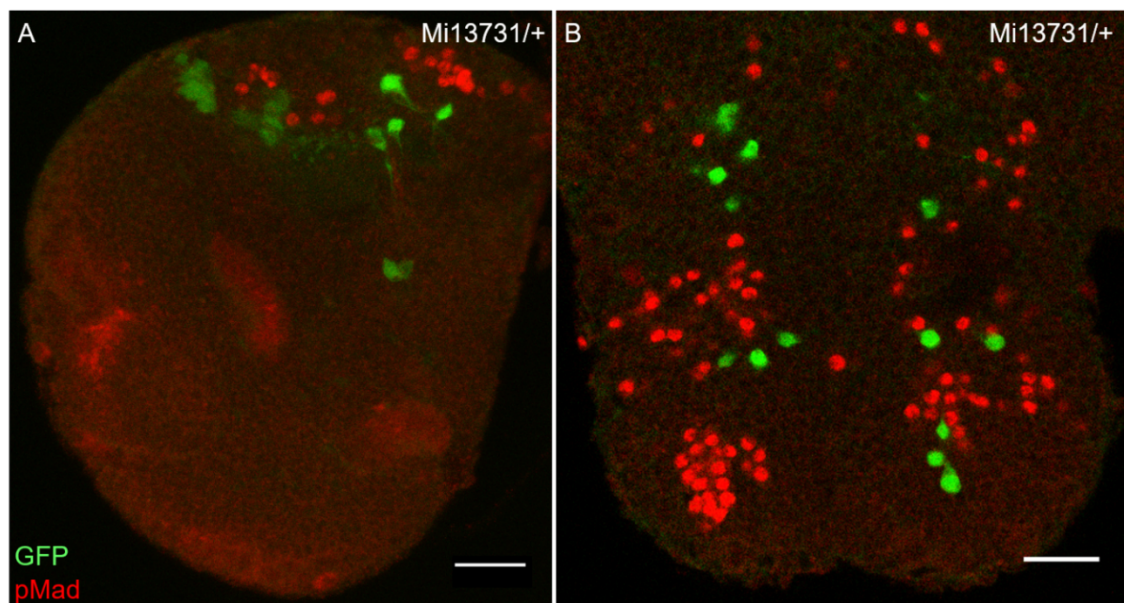


Abbildung 45: Fussel ist nicht in Zellen exprimiert, in denen der Dpp-Signalweg aktiv ist. In Fuss-Neuronen im larvalen Gehirn (A) oder VNS (B) kann keine pMad-Expression nachgewiesen werden. Der verwendete Genotyp ist Mi13731/+. Stacks. Balken entsprechen 25μm.

Theoretisch wäre es auch möglich, dass Fuss den Dpp-Signalweg inaktiviert. Mit Hilfe der Mutante Mi13731 wurde deshalb untersucht, ob Fuss bereits die Phosphorylierung von Mad und somit die Aktivierung des Dpp-Signalwegs verhindert.

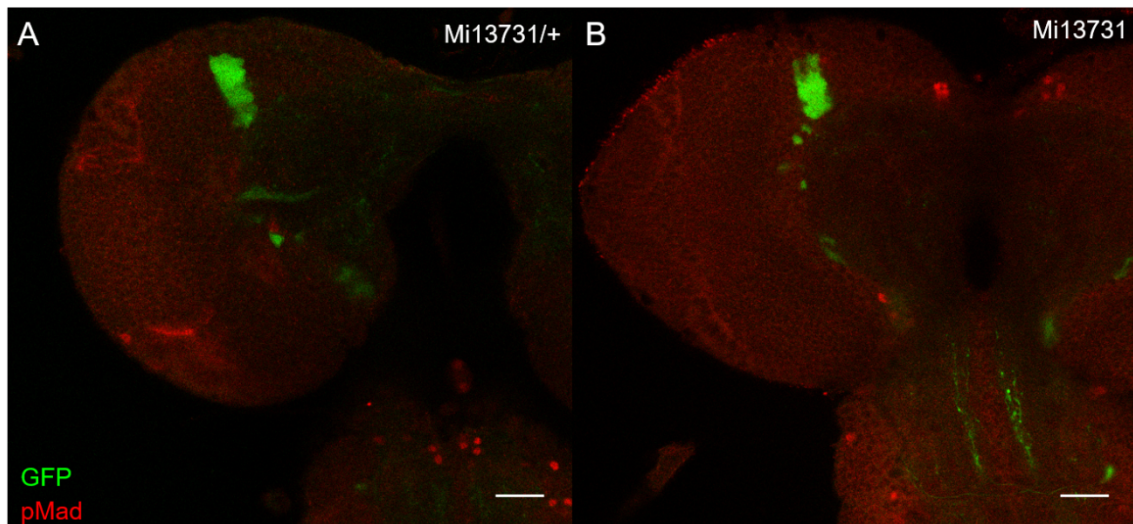


Abbildung 46: In Fuss-mutanten Neuronen kann kein pMad detektiert werden. GFP-positive Neurone, die kein Fussel mehr exprimieren (B), weisen wie die Kontrolle (A) keine Färbung von phosphoryliertem Mad auf. Verwendete Genotypen sind Mi13731/+ (A) und Mi13731 (B). Stacks. Balken entsprechen 25µm.

Es kann aber wie in der heterozygoten Mi13731/+-Linie (Abb. 46A) kein pMad in GFP-positiven Zellen in larvalen Gehirnen der homozygoten Mi13731-Linie (Abb. 46B) detektiert werden. Somit kann ausgeschlossen werden, dass Fuss den Dpp-Signalweg inhibiert.

2.5.4 Fussel ist kein Regulator von Sparkling

Ein Großteil der bisherigen Arbeiten zur Funktion von Fuss basiert auf Überexpression von Fuss in unterschiedlichen Geweben. Dabei konnte gezeigt werden, dass Fuss u. a. fähig ist, Sparkling (Spa) herunterzuregulieren. Überexpression von Fuss mit der Treiberlinie GMR-Gal4 führt zu einer glatten, linsenlosen Augenoberfläche. Dieser Phänotyp kommt zustande, da keine Kegelzellen und primären Pigmentzellen gebildet werden, wodurch keine Linsen sezerniert werden. Die molekulare Ursache dafür ist, dass Fuss Spa, welches ein Schlüsselprotein bei der Differenzierung von Kegel und primären Pigmentzellen ist, herunterreguliert (Raß, 2012). Weiter konnte in ChIPseq-Daten, bei denen Fussel im gesamten Embryo überexprimiert wurde, eine Bindung von Fuss an den *spa*-Genloкус gefunden werden (Anhang 65; Kullmann, 2014; Meier 2015). In Corl2-Knockout-Mäusen konnte beobachtet werden, dass Purkinjezellen im Gegensatz zur Kontrolle Pax2, das murine Homolog von Spa, exprimieren (Nakatani *et al.*, 2014).

Im larvalen Gehirn heterozygoter Mi13731/+-Larven kann in GFP-exprimierenden Fuss Neuronen keine Spa-Expression festgestellt werden (Abb. 47A). Gleichfalls kann in

Gehirnen homozygoter Mi13731-Larven kein Anstieg der Spa-Expression in GFP-exprimierenden Fuss-mutanten Neuronen beobachtet werden (Abb. 47B).

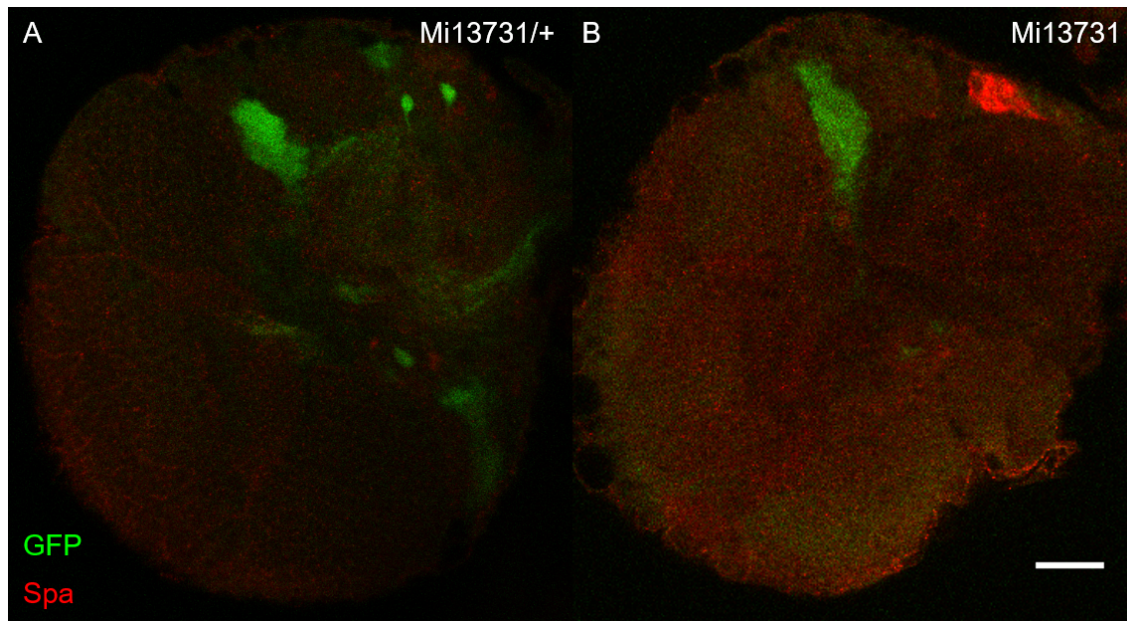


Abbildung 47: Fuss ist kein negativer Regulator von Spa. GFP-exprimierende Fuss-Neurone weisen im larvalen Gehirn der Kontrolle keine Spa-Expression auf. In GFP-exprimierenden Fuss-mutanten Neuronen kommt es zu keiner detektierbaren Spa-Expression. Verwendete Genotypen sind Mi13731/+ (A) und Mi13731 (B). Stacks. Balken entspricht 25µm.

Andererseits exprimieren Fuss-Neurone im larvalen subösophagalem Ganglion Spa (Abb. 48A, Stern). Diese Spa-Expression bleibt in Fuss-mutanten Neuronen von homozygoten Mi13731-Larven erhalten (Abb. 48B, Stern).

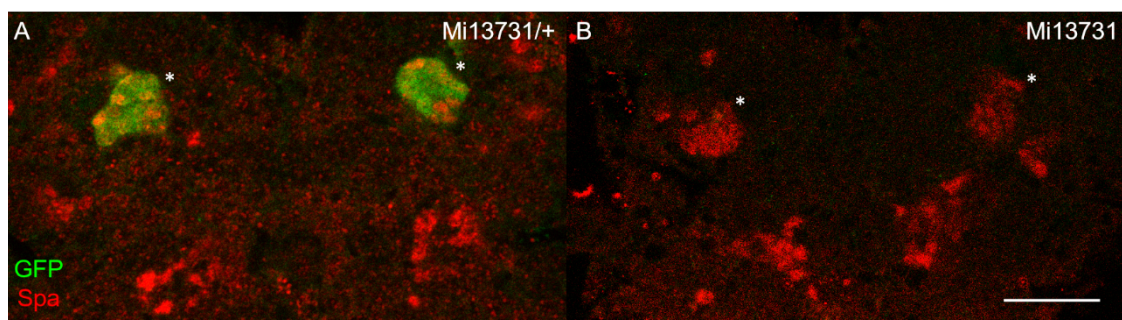


Abbildung 48: Fuss ist kein positiver Regulator von Spa. GFP-exprimierende Fuss-Neurone im larvalen, subösophagalem Ganglion der Reporterlinie Mi13731/+ exprimieren Spa (A, Stern). Die Spa-Expression bleibt auch in Fuss-mutanten Neuronen erhalten, die kein GFP mehr exprimieren (B, Stern). Verwendete Genotypen sind Mi13731/+ (A) und Mi13731 (B). Stacks. Balken entspricht 25µm.

Obwohl eine Bindung an den *spa*-Lokus und eine verringerte Spa-Expression bei der Fuss-Überexpression mit GMR-Gal4 nachgewiesen werden konnte, kann im larvalen Gehirn keine positive oder negative Regulation von Spa durch Fussel beobachtet werden.

2.6 Verhaltensanalyse adulter Fuss-Mutanten

Bisher beschränkte sich die Analyse der Funktion von Fussel auf die embryonale und larvale Entwicklung. Dagegen zeigen Antikörperfärbungen und semiquantitative qPCRs, dass Fussel im adulten Stadium nach wie vor im Nervensystem exprimiert wird. Nachfolgend sollte geklärt werden, welche Folge das Fehlen der Fuss-Expression während der Entwicklung auf das Verhalten von adulten Fliegen hat.

2.6.1 Fussel ist nicht in den adulten Uhrneuronen exprimiert

Nach der Entwicklung wird Fuss im adulten Gehirn weiterhin in Neuronen-Cluster und einzelnen Neuronen exprimiert. Auffällig ist dabei die Verteilung der einzelnen Cluster, speziell das laterale Cluster ist interessant, da dieses in der akzessorischen Medulla sitzt (Abb. 49A, Stern).

Um ein besseres Verständnis zu erlangen, welche Teile des Gehirns durch die Fuss-Neurone innerviert werden, wurde zellmembranlokalisiertes CD8-GFP mit der *fuss*-Gal4-Linie exprimiert. Wie bereits vermutet, innervieren die Fuss-Neurone der akzessorischen Medulla die Medulla. Daneben findet sich auch eine Vielzahl an Projektionen in die Lobula und die Lobulaplatte. Somit nehmen Fuss-Neurone Informationen aus dem optischen System auf (Abb. 49B). Für die Identifikation der Neurone, mit welchen die Fuss-Neurone im optischen Lobus in Verbindung stehen, sind jedoch weitere Experimente nötig.

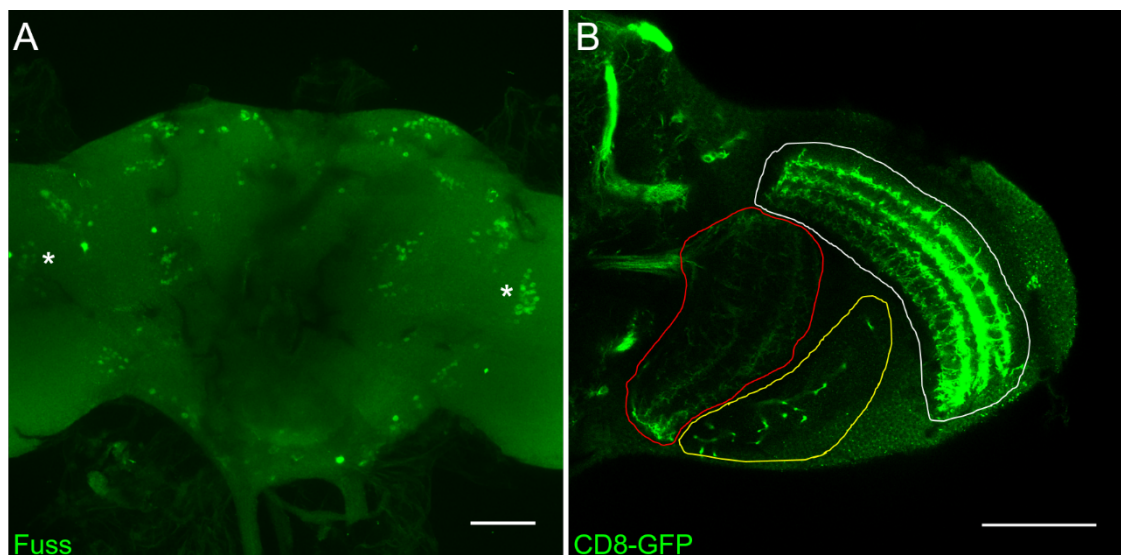


Abbildung 49: Fuss ist adult exprimiert und Fuss-Neurone projizieren in den optischen Lobus. Fuss ist adult in Neuronen-Clustern und einzelnen Neuronen exprimiert (A). Eines dieser Neuronen-Cluster sitzt in der akzessorischen Medulla (A, Stern). Sehr viele Projektionen der Fuss-Neurone können in der Lobula (rot umrandet), Lobulaplatte (gelb umrandet) und Medulla (weiß umrandet) detektiert werden (B).

Verwendete Genotypen sind CantonS (A) und UAS-CD8-GFP; *fuss*-Gal4/+ (B). Stacks. Balken entspricht 50µm.

Prominente Neurone, deren Zellkörper in der akzessorischen Medulla liegen, sind die PDF (Pigment-Dispersing-Factor)-Neurone (Lin *et al.*, 2004a). Diese Neurone gehören zu den Uhrneuronen und sind für die Kontrolle der Aktivitäten während des Tagesverlaufs wichtig. Eine Färbung mit anti-PDF an adulten Gehirnen von heterozygoten Mi13731/+ -Fliegen zeigt aber, dass Fuss-Neurone kein PDF exprimieren. Die Axone der PDF-Neurone enden auch in weiter außenliegenden Bereichen in der Medulla im Gegensatz zu den Axonen der Fuss-Neuronen (Abb. 50A - A''). Die Anzahl der PDF-Neurone bzw. die Axone der PDF-Neurone werden durch eine fehlende Fussel-Expression wie erwartet nicht beeinträchtigt (Abb. 50B - B'').

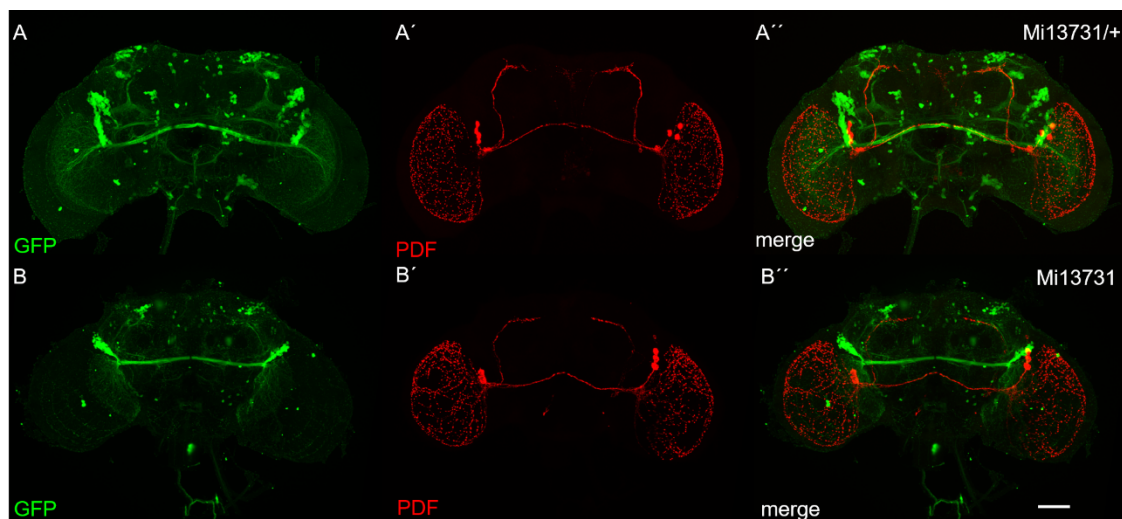


Abbildung 50: Fuss ist nicht in den PDF-Neuronen exprimiert und beeinflusst diese nicht. GFP-positive Fuss-Neurone liegen sehr nah an den PDF-Neuronen. Kein Fuss-Neuron ist jedoch PDF-positiv. Ein Fehlen der Fuss-Expression hat keinen Einfluss auf die Anzahl der PDF-Neurone und deren Projektionen. Verwendete Genotypen sind UAS-CD8-GFP; *fuss*-Gal4/+ (A - A'') und UAS-CD8-GFP; *fuss*-Gal4 (B - B''). Stacks. Balken entspricht 50 µm.

Bei weiteren Fuss-Neuronen könnte es sich aufgrund deren Lage um Uhrneurone handeln. Dies wurde mit einer Färbung gegen das in Uhrneuronen stark exprimierte Protein Vrille in Fliegen des Genotyps UAS-CD8-GFP; *fuss*-Gal4/+ überprüft.

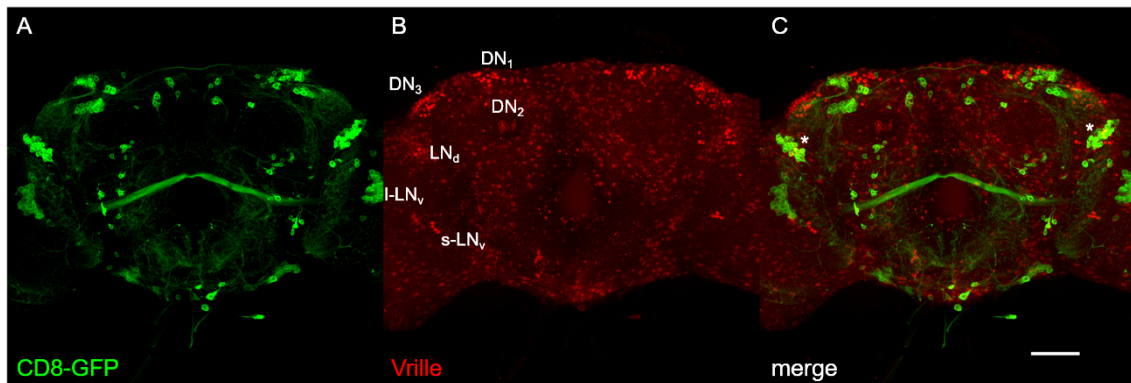


Abbildung 51: Fuss-Neurone sind keine Uhrneurone. Vrille (B), ein Uhrneuronenmarker, zeigt keine Kolo-kalisation (C) mit CD8-GFP-exprimierenden Fuss-Neuronen (A). Die Überlappung zwischen Vrille und CD8-GFP im LN_d -Neuronen-Cluster (C, Stern) kommt durch ein Signal aus unterschiedlichen Ebenen und nicht durch Kolo-kalisation zustande. DN = dorsale Uhrneurone. LN_d = laterodorsale Uhrneurone. l- LN_v = große, ventrolaterale Uhrneurone. s- LN_v = kleine, lateroventrale Uhrneurone. Genotyp ist UAS-CD8-GFP; *fuss*-Gal4/+. Stacks. Balken entspricht 50µm.

Dabei kann keine Kolo-kalisation zwischen GFP und Vrille festgestellt werden (Abb. 51A - C). Eine genauere Betrachtung der LN_d -Uhrneurone zeigt in der orthogonalen Schnittdarstellung, dass diese Uhrneurone lediglich benachbart zu den Fuss-Neuronen liegen (nicht gezeigt).

2.6.2 Fuss-mutante Fliegen halten länger Siesta

Adulte, homozygote y^- ; Mi13731(y^+)-Männchen (hier als MIB bezeichnet) wurden mit dem TriKinetics-System untersucht. Damit werden Bewegungen der Fliegen individuell über einen gewählten Zeitraum aufgezeichnet und somit können Aussagen u.a. über circadiane Rhythmik oder Schlaf getroffen werden. Als Kontrollen wurden Mi13731-Weibchen zu y^- -Männchen und CantonS-Weibchen mit y^- -Männchen gekreuzt und die daraus resultierenden Männchen der F1-Generation verwendet. Die Kontrollen werden als y x CantonS und y x MIB bezeichnet. Die Fliegen wurden bei konstanter Temperatur (25°C) fünf Tage lang vor dem eigentlichen Experiment auf einen 12h-Hell/12h-Dunkel-Rhythmus (LD) eingestimmt. Danach wurde ihre Aktivität sieben Tage bei LD-Rhythmus und 10 Tage in konstanter Dunkelheit (DD) aufgezeichnet, um die Freilaufperiode zu bestimmen. Eine wichtige Größe ist dabei der Zeitgeber Zeit (ZT), diese gibt die vergangene Zeit nach dem Zeitpunkt an, an dem das Licht angeht. Für die Aktivitätsmessung wurde der Zeitraum zwischen Zeitgeber Zeit 4 und 8 ausgewertet. Das Experiment und die Auswertung wurden von Matthias Schlichting (Universität Würzburg) durchgeführt.

Da keine Expression von Fuss in den Uhrneuronen gefunden werden konnte, führt das Fehlen der Fuss-Expression wie erwartet zu keiner Veränderung der circadianen

Rhythmik im Vergleich zu den Kontrollen während des LD-Zyklus (Abb. 52A, B). Ebenso kommt es in konstanter Dunkelheit zu keiner Veränderung der Freilaufperiode der homozygoten MIB-Männchen im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 52F). Dafür kann ein signifikanter Abfall der Aktivität bei homozygoten MIB-Männchen in der Siesta gemessen werden. (Abb. 52C). Zudem verbleiben diese Männchen über sechs Stunden in der Siesta, während Kontrollen nur vier Stunden Siesta halten (Abb. 52D). So beginnt die Siesta früher und endet später, dies wird daraus ersichtlich, dass die Aktivität nach dem *morning peak* schneller abfällt und vor dem *evening peak* später ansteigt (Abb. 52B). Die verlängerte Siesta der homozygoten Mi13731-Fliegen ist aber kein Resultat, dass sich der zeitliche Abstand zwischen dem morgendlichen (*morning peak*, M) und dem abendlichen Aktivitätshöchststand (*evening peak*, E) vergrößert (Abb. 52E). Dieser Phänotyp konnte mit Fliegen, bei denen Fuss durch einen *knockdown* mittels *elav*-Gal4 in allen Neuronen herunterreguliert wurde, repliziert werden. Herunterregulierung von Fuss in allen Uhrneuronen oder nur in den dorsalen Uhrneuronen führt zu keiner Verlängerung der Siesta (Anhang 6.2).

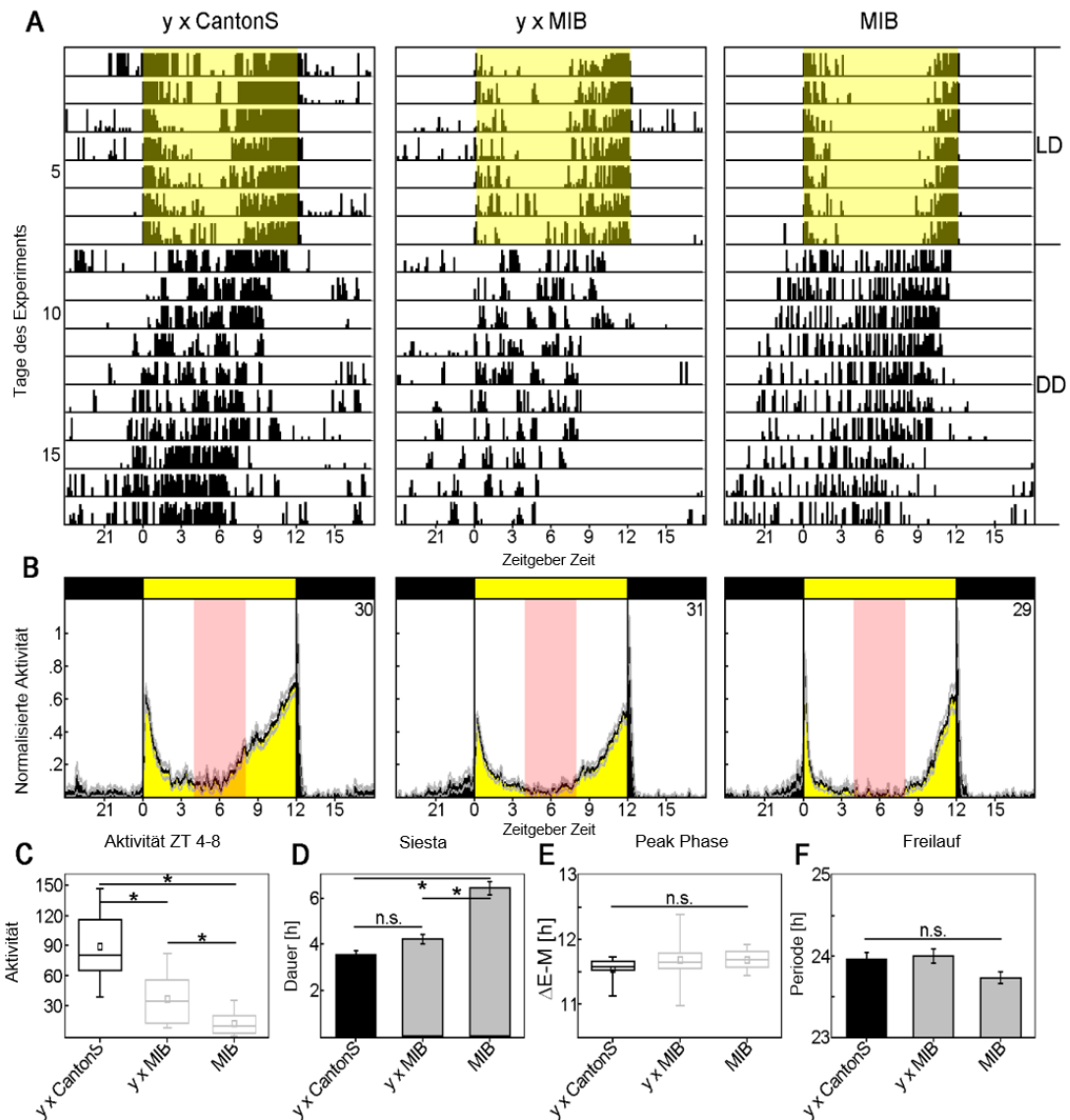


Abbildung 52: Analyse der Aktivität während des Tagesverlaufs von homozygoten Mi13731-Fliegen. Durchschnittliches Aktivitätsprofil aller getesteten Fliegen während der einzelnen Tage. Die ersten sieben Tage wurden die Fliegen in einem 12h-Hell/12h-Dunkel-Rhythmus (LD) gehalten, gefolgt von 10 Tagen in konstanter Dunkelheit (DD). Kennzeichnung der „Licht an“-Periode in gelb (A). Bei den getesteten Genotypen handelt es sich um y x CantonS-, y x MIB- und homozygoten MIB-Männchen. Durchschnittliches Aktivitätsprofil der getesteten Genotypen im gesamten Zeitraum des LD-Zyklus (B). Durchschnittliche Aktivität der homozygoten Mi13731-Männchen ist während ZT4-8 im Vergleich zu den heterozygoten Mi13731/+ und y-Männchen drastisch verringert (C). Die Siesta der homozygoten Mi13731-Männchen ist signifikant verlängert im Gegensatz zu heterozygoten y x MIB- und y x CantonS-Männchen (D). Kein Unterschied im Abstand zwischen dem Aktivitätsmaximum am Morgen (*morning peak*, M) und am Abend (*evening peak*, E) zwischen homozygoten MIB- und heterozygoten y x MIB- und y x CantonS-Fliegen (E). In konstanter Dunkelheit konnte kein Unterschied in der Freilaufperiode der einzelnen Genotypen festgestellt werden (F).

2.6.3 Homozygote Mi13731-Männchen weisen eine altersabhängige Verringerung der Klettergeschwindigkeit auf

Da Mi13731-Fliegen eine verringerte Aktivität während der Siesta aufweisen, wurde überprüft, ob die Lokomotorik selbst durch das Fehlen von Fussel beeinträchtigt wird. Hierfür wurde das negative Geotaxis-Verhalten analysiert.

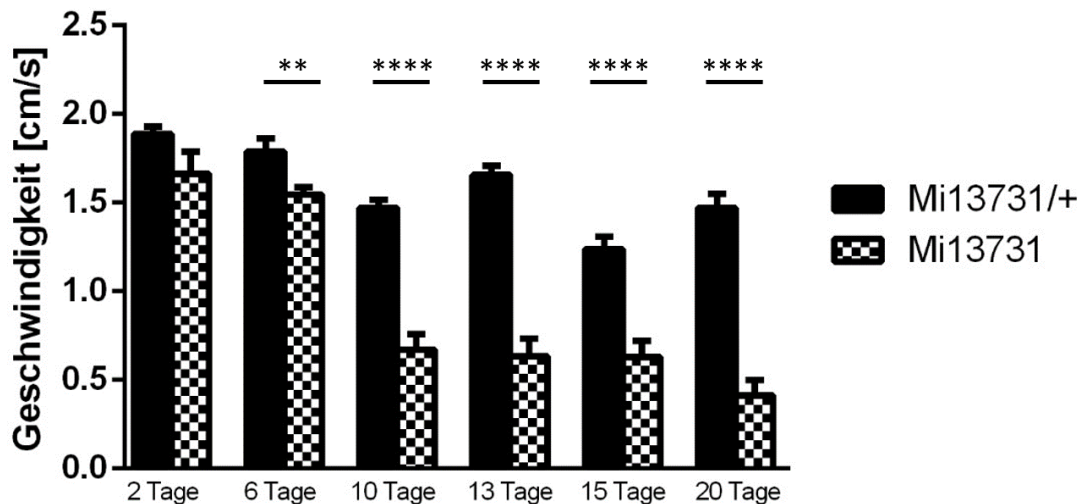


Abbildung 53: Verringerung der Klettergeschwindigkeit von homozygoten Mi13731-Männchen mit zunehmendem Alter. Zwischen zwei Tage alten, homozygoten Mi13731-Männchen ($v = 1,66\text{cm/s}$) und der heterozygoten Mi13731/+-Kontrolle ($v = 1,89\text{cm/s}$) kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei sechs Tage alten Männchen besteht ein signifikanter Unterschied zwischen homozygoten Mi13731-Männchen ($v = 1,79\text{cm/s}$) und der Kontrolle ($v = 1,54\text{cm/s}$). Drastische Verringerung der Klettergeschwindigkeit ist erkennbar bei 10 Tage alten, homozygoten Mi13731-Männchen ($v = 0,67\text{cm/s}$) im Gegensatz zur Kontrolle ($v = 1,47\text{cm/s}$). Geschwindigkeit bleibt bis 20 Tage konstant niedrig (Bei 13 Tagen: $v(\text{Mi13731}) = 0,63\text{cm/s}$, $v(\text{Mi13731}/+) = 1,66\text{cm/s}$; bei 15 Tagen: $v(\text{Mi13731}) = 0,63\text{cm/s}$, $v(\text{Mi13731}/+) = 1,24\text{cm/s}$). Weitere Verringerung der Klettergeschwindigkeit zeigt sich bei 20 Tage alten, homozygoten Mi13731-Männchen ($v = 0,41\text{cm/s}$) im Vergleich zur Kontrolle ($v = 1,47\text{cm/s}$). ** = $p < 0,01$. **** = $p < 0,0001$.

Bei homozygoten Mi13731-Männchen nimmt die Klettergeschwindigkeit mit zunehmendem Alter ab. Kurz nach dem Schlüpfen ist noch kein Unterschied zwischen zwei Tage alten homozygoten Mi13731- ($v = 1,66\text{cm/s}$) und heterozygoten Mi13731/+ -Männchen ($v = 1,88\text{cm/s}$) in Bezug auf die Klettergeschwindigkeit feststellbar, aber sechs Tage alte homozygote Mi13731-Männchen ($v = 1,54\text{cm/s}$) weisen bereits eine signifikant reduzierte Klettergeschwindigkeit im Gegensatz zu heterozygoten Männchen ($v = 1,79\text{cm/s}$) auf. Mit zunehmendem Alter vergrößert sich der Unterschied in der Klettergeschwindigkeit von homozygoten zu heterozygoten Mi13731-Männchen drastisch. So klettern zehn Tage alte Fuss-mutante Fliegen im Durchschnitt mit einer Geschwindigkeit von $0,67\text{cm/s}$ während die Kontrolle noch eine Geschwindigkeit von

1,47cm/s erreicht. Bei 20 Tagen ist eine weitere Verringerung der Klettergeschwindigkeit bei homozygoten Mi13731-Fliegen ($v = 0,41\text{cm/s}$) im Vergleich zur Kontrolle ($v = 1,47\text{cm/s}$) nachweisbar (Abb. 53).

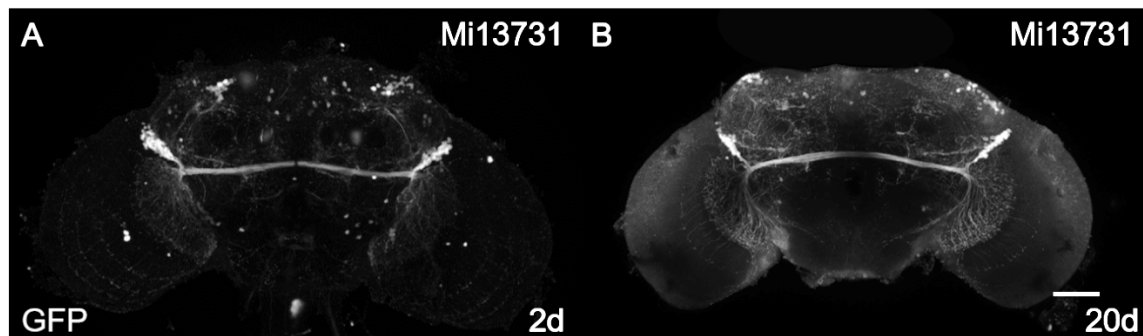


Abbildung 54: Kein Verlust von mutanten Fuss-Neuronen mit zunehmendem Alter. Zwischen zwei (A) und zwanzig (B) Tage alten, adulten Gehirnen des Genotyps Mi13731 kann kein Unterschied im GFP-Expressionsmuster festgestellt werden (B). Stacks. Balken entspricht 50 μm .

Um zu untersuchen, ob die mit zunehmenden Alter abnehmende Klettergeschwindigkeit durch eine altersabhängige Degeneration der Fuss-Neurone ausgelöst wird, wurde das GFP-Expressionsmuster von adulten Gehirnen zwei bzw. zwanzig Tage alter homozygoter Mi13731-Männchen verglichen. Jedoch zeigen adulte Gehirne von zwei (Abb. 54A) und zwanzig (Abb. 54B) Tage alten, homozygoten Mi13731-Männchen das gleiche GFP-Muster. Demnach gibt es keinen vermehrten Zelltod in den GFP-exprimierenden Zellen. Über Zellen die aufgrund der fehlenden Expression von Fussel in der homozygoten Mi13731-Linie kein GFP mehr exprimieren, kann keine Aussage getroffen werden. Folglich kann die mit zunehmendem Alter verringerte Klettergeschwindigkeit der homozygoten Mi13731-Männchen nicht durch Zelltod erklärt werden.

2.6.4 Mi13731-Fliegen haben eine verringerte Koffeinrezeption

In adulten Fliegen kann Fuss-Expression in gustatorischen Neuronen (GRN) der Labialpalpi detektiert werden. Adulte besitzen je Labialpalpus 31 bis 34 chemosensorische Borsten und zwei rein mechanosensorische Borsten. Die *fuss*-Gal4-Linie exprimiert in 31 bis 34 GRNs (Abb. 55A). Auffällig ist dabei, dass diese GRNs nie die gleiche Borste innervieren und dadurch davon ausgegangen werden kann, dass pro chemosensorischer Borste eine Fuss-positive GRN existiert. Die zwei mechanosensorischen Borsten werden nicht von Fuss-positiven GRNs innerviert. Eine Möglichkeit Rückschlüsse auf die Identität dieser GRNs zu ziehen liegt darin, die Projektionen im subösophagealen Ganglion zu analysieren. Dabei konnte festgestellt

werden, dass die Projektionen der Fuss-positiven GRNs (Abb. 55C), den Projektionen der *Gr66a*-Gal4-Linie ähneln (Abb. 55D). GR66a ist in allen bitter registrierenden Neuronen exprimiert und wird für die Detektion von Koffein und *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET) benötigt (Lee *et al.*, 2010; Moon *et al.*, 2006; Weiss *et al.*, 2011).

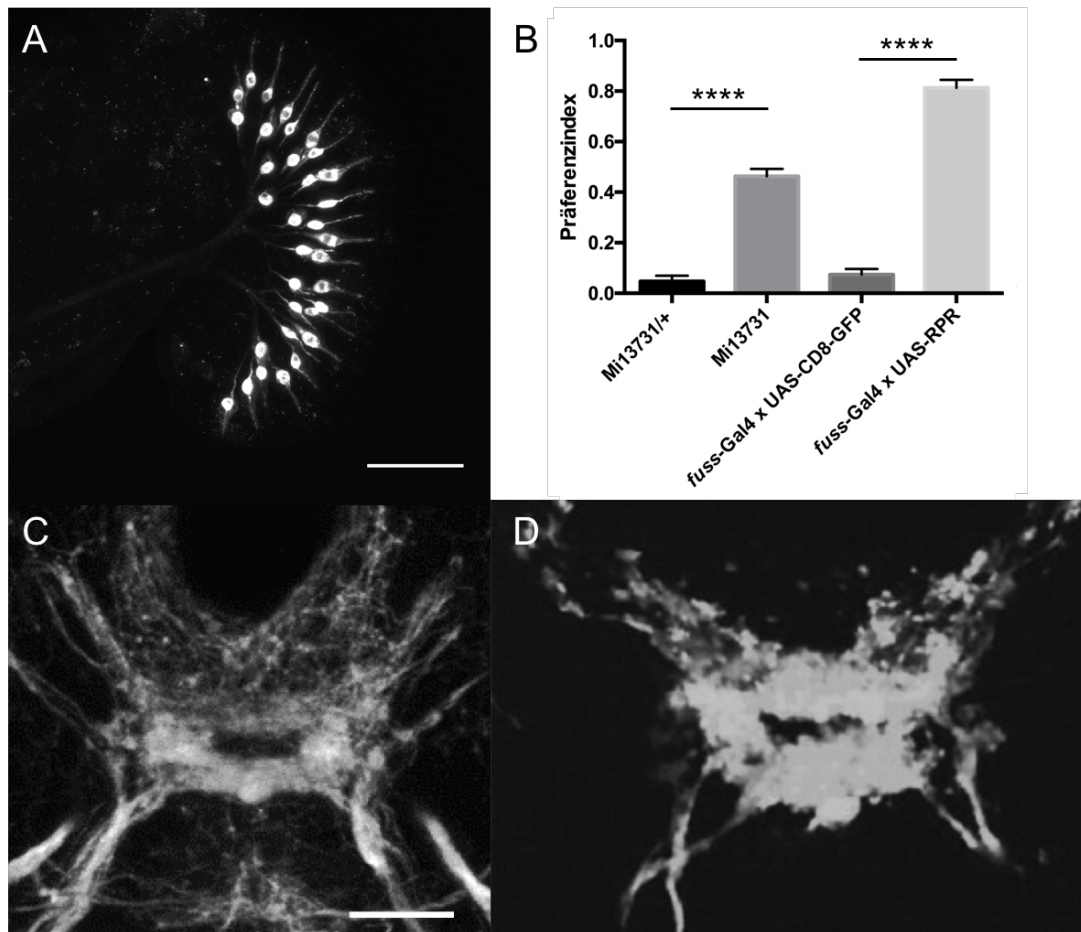


Abbildung 55: Analyse der Expression und Funktion von Fuss in den gustatorischen Neuronen. Fuss wird in 31 bis 34 chemosensorischen, gustatorischen Neuronen exprimiert (B), die jeweils eine Borste innervieren. In einem *two choice feeding assay* besitzen Fliegen des Genotyps *Mi13731* und *UAS-RPR/+*; *fuss-Gal4/+* eine erhöhte Präferenz für eine 5mM Sucroselösung versetzt mit 10mM Koffein als die Kontrollen *Mi13731/+* und *UAS-CD8-GFP/+*; *fuss-Gal4/+*. Vergleich des Projektionsmusters der gustatorischen Neurone des Genotyps *UAS-CD8-GFP/+*; *fuss-Gal4/+* mit *UAS-CD8-GFP/+*; *Gr66a-Gal4/+* ist sehr ähnlich. Stacks. Balken entsprechen 50µm (A) bzw. 20µm (C) (Abb. D nach Wang *et al.*, 2004). **** = $p < 0,0001$.

Um zu analysieren, ob Fuss unter anderem in diesen Neuronen exprimiert ist, wurde ein *two choice feeding assay*, wie unter 5.5.1 beschrieben, durchgeführt. Als Bitterstoff wurden 10mM Koffein eingesetzt. Einerseits wurde die homozygote *Mi13731*-Linie mit heterozygoten *Mi13731/+*-Fliegen verglichen, andererseits wurden Fliegen, bei denen durch die Expression von Reaper mit der *fuss-Gal4*-Linie die Fuss-exprimierenden Zellen ablatiert wurden, mit Fliegen, die CD8-GFP in den Fuss Zellen exprimierten, verglichen. Würde es sich um die GR66a-exprimierenden GRNs handeln, müsste zumindest eine

Verschlechterung der Koffeindetektion bei Fliegen ohne Fuss-exprimierende Zellen vorliegen.

Während sowohl die heterozygoten Mi13731/+-Fliegen (Präferenz: 0,047; Anzahl der Replikate: 7) als auch die GFP-exprimierenden *fuss*-Gal4-Fliegen (Präferenz: 0,073; Anzahl der Replikate: 8) eine deutliche Präferenz für 1mM Sukrose aufweisen, bevorzugen homozygote Mi13731-Fliegen (Anzahl der Replikate: 10) die 5mM Sucrose beinhaltende Lösung, obwohl diese 10mM Koffein enthielt. Bei einem Präferenzindex von 0,463 bei den homozygoten Mi13731-Fliegen entscheidet sich somit die Hälfte für die 5mM Sukroselösung trotz des Bitterstoffs. Noch drastischer fällt das Ergebnis bei Fliegen (Anzahl der Replikate: 6), bei welchen mittels Reaper-Expression die Fuss-Zellen ablatiert wurden, aus, da diese einen durchschnittlichen Präferenzindex von 0,813 besitzen (Abb. 55B).

Während der Entwicklung konnten keine molekularen Phänotypen bei homozygoten Mi13731-Fliegen oder Fliegen des Genotyps UAS-RPR/+; *fuss*-Gal4/+ gefunden werden. Dagegen zeigen adulte Fliegen dieser Genotypen deutliche Verhaltensphänotypen. So weisen homozygote Mi13731-Fliegen eine stark reduzierte Aktivität während der Siesta und eine verlängerte Siestaperiode auf. Weiter verringert sich die Klettergeschwindigkeit mit zunehmendem Alter stark und die Fähigkeit zur Detektion von Koffein ist beeinträchtigt.

2.7 Analyse des onkogenen Potentials von Fuss

Fuss gehört zur Familie der Ski/Sno-Proteine. Diese Proteine werden als Protoonkogene eingestuft. So fördert z. B. Ski das Wachstum und die Progression von Melanomen und Magentumoren (Chen *et al.*, 2009; Kiyono *et al.*, 2009; Reed *et al.*, 2005). Um festzustellen, ob Fuss-Expression ebenfalls zu tumorigen Auswüchsen führt, wurde mit GFP-fusioniertes Fuss (Fuss-GFP) während der Entwicklung in unterschiedlichen Geweben oder Zellen überexprimiert.

2.7.1 Nur klonale Expression von Fuss in Augenscheiben führt zu Auswüchsen

So wurde Fuss u.a. in Typ I und Typ II Neuroblasten überexprimiert, aber in keinem Fall resultiert dies in einer erhöhten Anzahl von Neuroblasten. Überexpression in anderen Geweben oder Zellen führt ebenfalls nicht zu einer erhöhten Zellzahl. Eine weitere Methode, welche zur Überexpression von Fuss verwendet wurde, war das FLP-FRT-

System zur Erzeugung von Fuss-überexprimierenden, klonalen Zellen (Fuss-Klone). Dazu wurden Larven 48h nach Eiablage zwölf Minuten lang bei 37°C hitzegeschockt. Dies führte dazu, dass die Rekombinase Flippase kurzzeitig in zufälligen Zellen exprimiert wird und bei *act-FRT-stop-FRT-Gal4* die FRT-stop-FRT-Kassette, die die Expression von Gal4 unter der Kontrolle des *act*-Promotors inhibiert, entfernt wird. In diesen Zellen wird nachfolgend dauerhaft UAS-Fuss-GFP unter Kontrolle des *actin*-Gal4-Treibers exprimiert. Nur mittels dieses Systems ist es möglich in späten L3-Larven Auswüchse aus der Augenimaginalscheibe zu erzeugen, die auf eine Störung in der Zellproliferation hinweisen könnten. Ausschließlich in den Augenimaginalscheiben konnten Auswüchse beobachtet werden. Gleichzeitig führt die Induktion der Fuss-überexprimierenden Klone aber auch zur Letalität der Individuen in der Pupalphase. Nur wenn die Induktionszeit der Fuss-Klone von zwölf auf zwei Minuten verringert wird, können einzelne adulte Fliegen mit Auswüchsen in den Augen isoliert werden (Abb. 56).



Abbildung 56: Adulte zeigen Auswüchse aus den Augen. Adulte die nur kurz hitzegeschockt wurden, weisen Auswüchse aus den Augen auf. Verwendeter Genotyp ist *Flp22/y; UAS-Fuss-GFP/+; FRT-actin-Gal4/+*.

Nachfolgend ist die Analyse der Auswüchse der Augenimaginalscheibe dargestellt.

2.7.2 Fuss-Klone exprimieren keine retinalen Differenzierungsmarker

Die Auswüchse, die durch Fuss-Klone entstanden sind, befinden sich ausschließlich in der Augenimaginalscheibe. Durch den Einsatz von Antikörpern gegen unterschiedliche Marker für retinale Differenzierung sollte geklärt werden, ob Fuss-Klone zu Retinalzellen differenzieren oder die Expression von Fuss die Differenzierung dieser Zellen inhibiert.

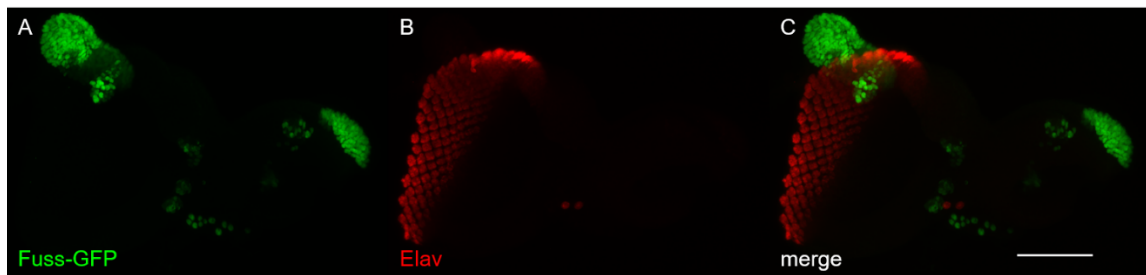


Abbildung 57: Fuss-Klone differenzieren nicht zu Photorezeptorzellen. Die Auswüchse, die aus Fuss-klonalen Zellen (A, C) bestehen, weisen keinen Neuronenmarker Elav (B, C) auf. Verwendeter Genotyp ist Flp22/y; UAS-Fuss-GFP/+; FRT-*actin*-Gal4/+. Stacks. Balken entspricht 50 μ m.

Dazu wurden Antikörper gegen den panneuronalen Marker Elav (Abb. 57B, C) verwendet. So konnte gezeigt werden, dass Fuss-Klone (Abb. 57A, B) nicht zu Photorezeptoren differenzieren.

Ob bereits frühe Phasen der Photorezeptordifferenzierung durch Fuss-Klone gestört werden, wurde mit den Markern Dac und Dpp überprüft. Dac wird normalerweise vor, in und hinter der morphogenetischen Furche exprimiert (Mardon *et al.*, 1994).

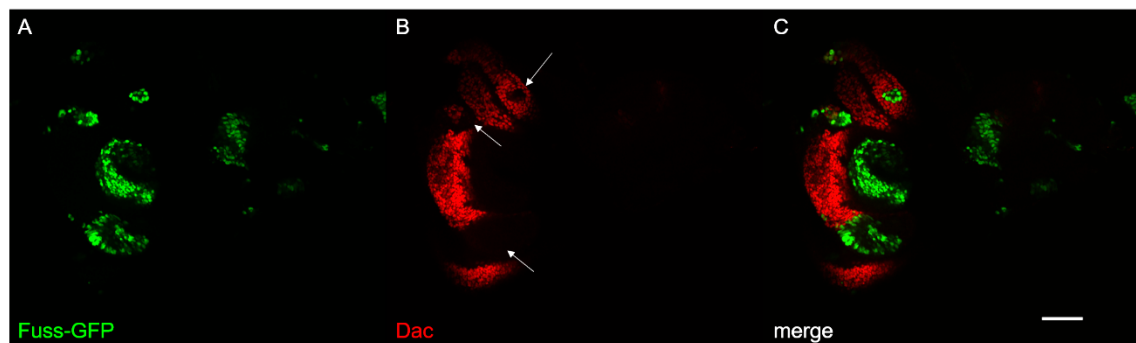


Abbildung 58: Das retinale Determinierungsgen Dac ist nicht in Fuss-Klonen exprimiert. Die Expression von Dachshund (B, Pfeile) wird durch Fuss-Klone (A;C) inhibiert. Verwendeter Genotyp ist Flp22/y; UAS-Fuss-GFP/+; FRT-*actin*-Gal4/+. Einzelbildaufnahmen. Balken entspricht 50 μ m.

In Fuss-Klonen (Abb. 58A, C) kann dagegen keine Dac-Expression (Abb. 58B, C) nachgewiesen werden.

Dac gehört zusammen mit Sine oculis und Eyes absent zu wichtigen Proteinen, die für die Photorezeptordifferenzierung benötigt werden. Sie bilden zusammen eine positive Rückkopplungsschleife und beeinflussen ihre gegenseitige Transkription (Halder *et al.*, 1998). Ein Protein, das für die initiale Expression dieser Proteine nötig ist, ist Dpp (Curtiss und Mlodzik, 2000). Deswegen wurde untersucht, ob bereits die Expression von Dpp durch Fuss-Klone gestört wird. Dpp wird in der morphogenetischen Furche exprimiert.

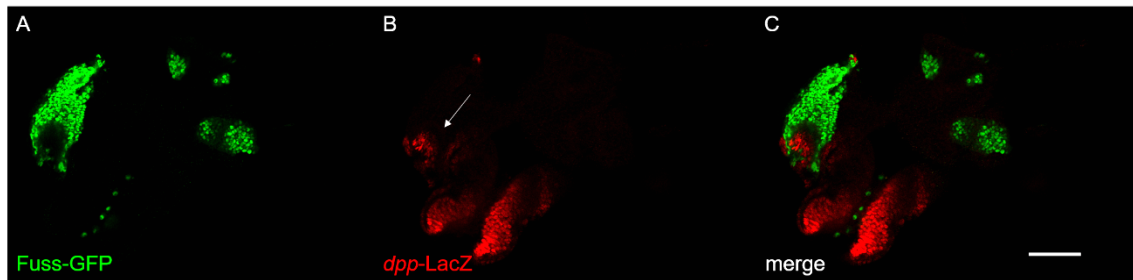


Abbildung 59: Überexpression von Fuss verhindert die Expression von Dpp. Mit Hilfe eines LacZ-Reporters kann die Expression von Dpp, welches in der morphogenetischen Furche exprimiert ist, verfolgt werden. Fuss-Klone (A, C) inhibieren die Expression des LacZ-Reporters (B, Pfeil) und somit von Dpp. Verwendeter Genotyp ist *Flp22/y; UAS-Fuss-GFP/dpp-LacZ; FRT-actin-Gal4/+*. Einzelbildaufnahmen. Balken entspricht 50 µm.

Wie schon die Expression von Dac ist die Expression von Dpp (Abb. 59B, C) in Fuss-Klonen (Abb. 59A, C) abwesend, was auch die fehlende Dac-Expression erklärt. Dies konnte mittels einer LacZ-Reporterlinie für Dpp überprüft werden.

2.7.3 Fuss-Klone und umliegende Zellen weisen erhöhte Proliferation auf

Da Fuss-Klone zu Auswüchsen in den Augenscheiben führen, wurde untersucht, ob die Fuss-Klone erhöhte Zellteilungen aufweisen. Dazu wurde mit Augenimaginalscheiben eine BrdU-Proliferationsanalyse, wie unter 5.3.6 beschrieben, durchgeführt. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen BrdU können so Zellen detektiert werden, die sich im Verlauf einer Stunde in der S-Phase befanden. In der Augenimaginalscheibe findet hinter der morphogenetischen Furche die sogenannte zweite mitotische Welle statt. Dabei handelt es sich um synchronisierte Zellteilungen, um ausreichend Zellen für die Ommatidien zu erzeugen. Hinter der zweiten mitotischen Welle finden aber kaum mehr Zellteilungen statt, da die Retinalzellen differenzieren und zu den Ommatidien rekrutiert werden (Tomlinson und Ready, 1987, Wolff und Ready, 1991).

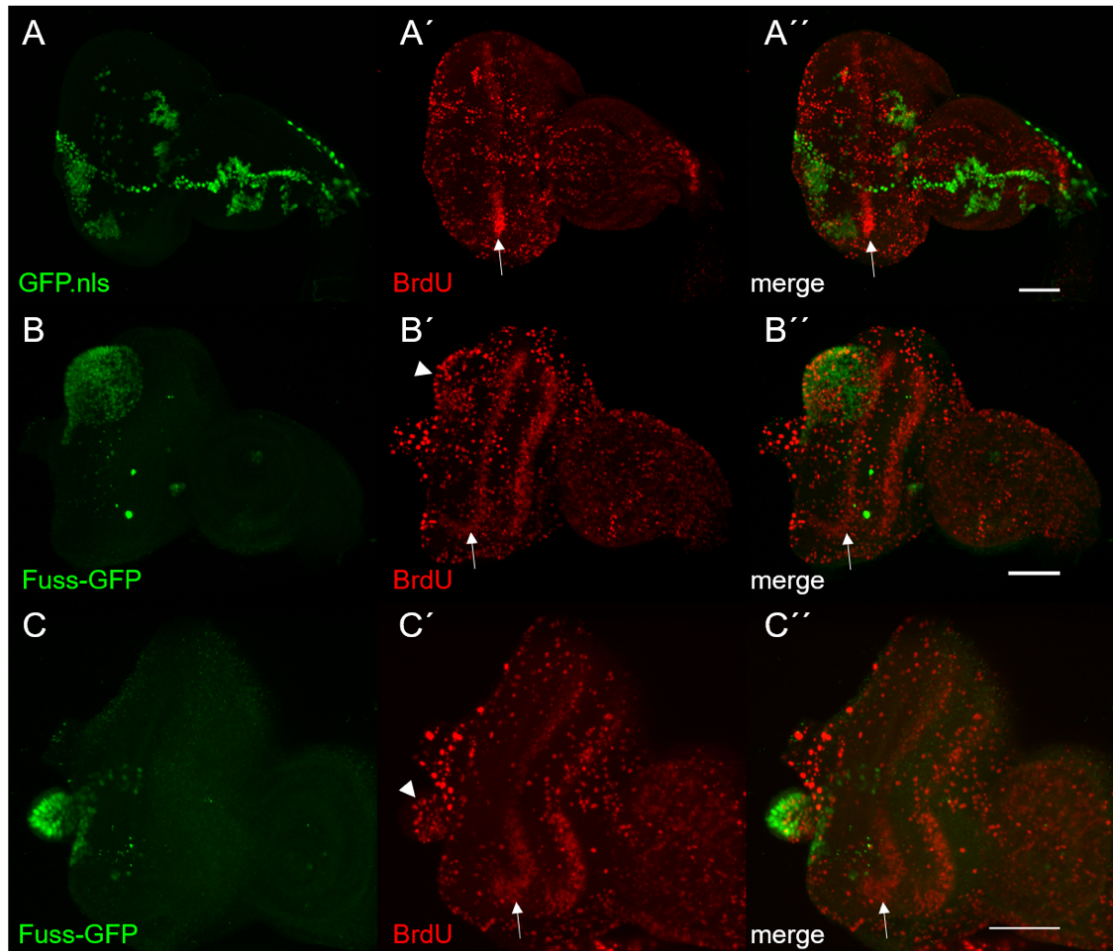


Abbildung 60: Fuss-Klone zeigen eine verstärkte Proliferation. S-Phasen wurden mittels des BrdU-Proliferationsanalyse und anschließender Antikörperfärbung gegen BrdU detektiert (A' - C'). Kontrollen, die nur kernlokalisiertes GFP exprimieren (A, A''), weisen posterior zur zweiten mitotischen Welle weniger S-Phasen (A', A'') auf, die hauptsächlich in Subretinalzellen ablaufen. In Fuss-Klonen und in direkt angrenzenden Zellen (B, B', C, C') können verstärkt S-Phasen (B', C', Pfeilspitze) beobachtet werden. Pfeil zeigt auf die zweite mitotische Welle. Verwendete Genotypen sind *Flp22/y; UAS-GFP.nls/+; FRT-actin-Gal4/+* und *Flp22/y; UAS-Fuss-GFP/+; FRT-actin-Gal4/+*. Stacks. Balken entspricht 50 µm.

Der Großteil der hinter der zweiten mitotischen Welle (Abb. 60A', A'', Pfeil) in der Kontrolle (Abb. 60A, A'') detektierten S-Phasen (Abb. 60A', A'') stammt von den Subretinalzellen, die sich weiterhin teilen. In Fuss-Klonen (Abb. 60B, B'', C, C'') finden dagegen hinter der zweiten mitotischen Welle (Abb. 60B', C', Pfeil) verstärkt S-Phasen (Abb. 60B', B'', C', C'', Pfeilspitze) und somit Zellteilungen statt. In Einzelaufnahmen können interessanterweise auch S-Phasen in umliegenden Zellen der Fuss-Klone beobachtet werden (nicht gezeigt).

2.7.4 Fuss-Klone exprimieren das Morphogen Wingless

Da auch Zellen, die um die Fuss-Klone herumliegen, verstärkt S-Phasen aufweisen, spricht dies dafür, dass Fuss-Klone auch die umliegenden Zellen beeinflussen und möglicherweise ein Morphogen ausschütten. Zudem konnte gezeigt werden, dass Fuss

die Expression von Dpp in den Klonen inhibiert. Der Dpp-Signalweg wird aber während der Augenentwicklung unter anderem für die Inhibierung der Wg-Expression benötigt (Chanut und Heberlein, 1997). Somit könnte es sich bei dem von den Fuss-Klonen ausgeschütteten Morphogen um Wg handeln. Wg wird in Augenscheiben von späten L3-Larven normalerweise nur am dorsalen und ventralen Rand exprimiert (Treisman und Rubin, 1995).

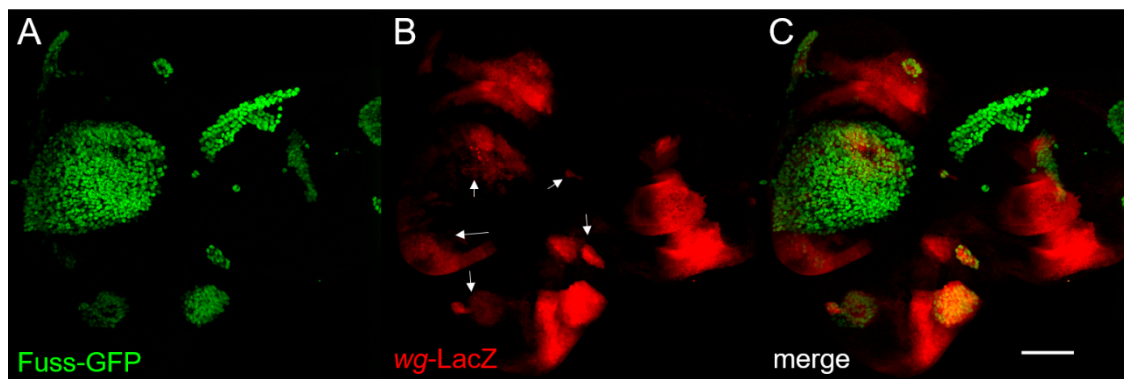


Abbildung 61: Fuss-Klone exprimieren Wg. Zur Detektion der Wg-Expression wurde ein LacZ-Reporter verwendet (B, C). Fuss-Klone (A, C) exprimieren LacZ und somit Wg (B, Pfeil) in der Augenscheibe. Verwendeter Genotyp ist *Flp22/y; UAS-Fuss-GFP/wg-LacZ; FRT-actin-Gal4/+*. Stacks. Balken entspricht 50 μm .

Mittels einer *wg-LacZ*-Reporterlinie konnte nachgewiesen werden, dass ein Großteil der in der Augenscheibe lokalisierten Fuss-Klone verstärkt Wg exprimieren. Dieser Effekt ist aber allein auf die Augenscheibe beschränkt, so wird die Wg-Expression in der Antennenscheibe nicht durch Fuss-Klone beeinflusst (Abb. 61).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Expression von Fuss-GFP in den Klonen die Expression von Dpp verhindert. Dadurch werden die retinalen Determinierungsgene nicht exprimiert und weiter führt das Fehlen der Dpp-Expression dazu, dass die Wg-Expression in den Fuss-Klonen nicht inhibiert wird. Somit differenzieren die Fuss-Klone nicht, sondern proliferieren weiterhin. Dies resultiert schließlich in den Auswüchsen, die in der Augenscheibe von späten L3-Larven beobachtet werden können. Klone, die nur Fuss exprimieren, führen ebenfalls in der Augenscheibe zu Auswüchsen. Demnach hat die Fusion von GFP mit Fuss keinen Einfluss auf die Funktion von Fuss (nicht gezeigt).

3 Diskussion

3.1 Die Antikörper gegen Fuss und die Mi13731-Linie sind für die Analyse der Fuss-Expression und Funktion bestens geeignet

Für die Erzeugung von Antikörper gegen Fuss wurde versucht Fuss auf unterschiedliche Weisen aufzureinigen. Nachdem aber das Fuss-Protein in ganzer Länge aufgrund Unlöslichkeit nicht aufgereinigt werden konnte (Abb. 18), wurde die Strategie geändert und nur ein Teil von Fuss in *E. coli* exprimiert (Abb. 23). Dieses wurde dann für die Antikörpererzeugung verwendet. Die gewonnenen Antikörper können jedoch trotz Affinitätsaufreinigung nicht direkt verwendet werden, da diese unspezifisch das ganze Gewebe färben. Nach einer Präabsorption gegen 5h alten Embryonen geben die Antikörper jedoch das gesuchte Fuss-Expressionsmuster wieder (Abb. 26).

Eine Möglichkeit die Löslichkeit des Volllängenproteins zu verbessern, wäre gewesen, Fuss mit einem anderen Protein wie dem maltosebindenden Protein oder dem NusA-Tag zu fusionieren, welche im Gegensatz zu GST die Löslichkeit stärker erhöhen (Kapust und Waugh, 1999; Costa *et al.*, 2014). Dies hätte aber gleichzeitig zu einer Erhöhung des molekularen Gewichts und womöglich zu einer schlechteren Exprimierbarkeit in *E. coli* geführt. Diese Tags geben jedoch keine Garantie auf erhöhte Löslichkeit des Fusionsproteins und müssen zudem durch Proteasen abgespalten werden, da sie stark immunogen sind. Ebenso kann es passieren, dass das Zielprotein nach der Abspaltung vom Tag aus der Lösung ausfällt. Eine Abspaltung bedeutet auch weitere Aufreinigungsschritte, um die Proteasen zu entfernen und somit möglicherweise eine niedrige Konzentration des Zielproteins.

Da Fuss ebenso wie Snoo eine Smad4-Bindedomäne und eine Ski/Sno-Homologiedomäne besitzt, bestand eine große Wahrscheinlichkeit, dass, falls das Volllängeprotein zur Antikörperherstellung genutzt worden wäre, das erzeugte polyklonale Antiserum nicht nur Fuss, sondern auch Snoo erkennt (Abb. 2; Fischer *et al.*, 2012).

Somit war es der einfachste und schnellste Weg nur einen Teil von Fuss, der aufgrund bioinformatischer Ergebnisse löslich ist, mit dem His-Tag zu versehen, der eine geringe Immunogenizität aufweist, und zu exprimieren (Zhao *et al.*, 2013).

Dennoch zeigte sich, dass die davon erzeugten Antikörper ohne Präabsorption nicht verwendbar sind, denn neben His-getagtem Fuss, band noch ein *E. coli*-Protein gegen die Säule und die Kaninchen erzeugten auch gegen dieses Protein Antikörper. Möglicherweise sind Antikörper, die das *E. coli*-Protein detektieren, für die unspezifischen Banden im Western Blot oder für die Färbung aller Zellen in der Immunhistochemie verantwortlich. Zukünftig könnte versucht werden mittels folgender Strategie diese Probleme zu umgehen. Dabei wird das zu exprimierende Protein einmal mit His- und einmal mit GST-Tag exprimiert. Anschließend wird das His getaggte Protein für die Immunisierung verwendet, während das GST-getaggte Protein für die Affinitätsaufreinigung verwendet wird. Dadurch wird ermöglicht, dass Antikörper von den Proteinverunreinigungen, die sich ebenfalls im Eluat befanden oder die den Tag erkennen, durch Affinitätsreinigung vollständig entfernt werden können und alle verbleibenden Antikörper nur das gewünschte Protein detektieren.

Nichtsdestotrotz können die hier entstandenen Antikörper anti-FussT1 und anti-FussT2 nach Präabsorption problemlos zur Detektion von Fuss eingesetzt werden. Dies verdeutlichte auch die Verwendung der anti-FussT2-Antikörper an Gehirnen heterozygoter bzw. homozygoter Mi131731-Larven. So konnten die Antikörper Fuss in heterozygoten Larven, aber nicht in homozygoten Larven detektieren. Bei homozygoten Larven konnte lediglich eine Färbung in wenigen Zellen im Zytoplasma beobachtet werden. Hierbei handelt es sich um eine unspezifische Antikörperfärbung, die durch die Präabsorption nicht entfernt werden konnte. Bei heterozygoten Larven stimmt das GFP-Expressionsmuster mit der Antikörperfärbung überein, was auch *vice versa* den Schluss zulässt, dass heterozygote Mi13731/+-Fliegen als Reporter und die homozygote Mi13731-Linie als Fuss-Mutante verwendet werden können (Abb. 30).

Mittlerweile hat sich aber gezeigt, dass dies nicht bei jeder MiMIC-Linie der Fall ist, während z.B. bei der Linie Mi^{cr44030} gar kein endogenes Transkript durch qPCR mehr detektiert werden kann, finden sich bei der Mi03207-Insertion, nachdem dieses in die richtige Orientierung gebracht wurde, noch über 50% des endogenen Transkriptes (Russow, 2016; Schramm, 2016). Somit ist bei der Verwendung der MiMIC-Linien eine genaue Analyse der verbliebenen Transkriptmengen und Proteinmengen äußerst wichtig.

3.2 Ein Teil der Fuss-Neurone stammt wohl von den Neuroblasten 5-6T, NB4-1 und NB4-2 ab

Bei der Expressionsanalyse von Fuss konnte gezeigt werden, dass Fuss während der Embryonalentwicklung bereits im ZNS und in einigen Zellen außerhalb des ZNS exprimiert wird. Zudem nimmt die Anzahl der Zellen im VNS während der Entwicklung von 1-2 auf 2-7 pro Hemineuromer zu. Fuss-Expression ist ab dem Abdominalsegment A8 zu beobachten und die Anzahl der Fuss-Neurone nimmt nach anterior zu (Abb. 35). Um die Abstammung der Fuss-Neurone von den Neuroblasten zu untersuchen, wurden unterschiedliche Zellabstammungslinienmarker verwendet. Aber nur mit den Markern Gooseberry (Anhang 6.3) und Hedgehog konnte in jeweils einer Zelle pro Thorakalsegment Überlappung mit Fuss gefunden werden. Christof Rickert (Universität Mainz) analysierte zudem die Lage der einzelnen Neurone und deren Projektionen, da dadurch ebenfalls Rückschlüsse gezogen werden können, von welchen Neuroblasten die Fuss-Neurone abstammen (Bossing *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997).

Aufgrund der Projektionen und da nur in den Thorakalsegmenten Neurone, die gleichzeitig Gooseberry und Fuss exprimieren, gefunden werden konnte, kam Christof Rickert zu dem Schluss, dass diese Neurone vom NB5-6T Neuroblasten abstammen. Denn Neuroblasten der 5er und 6er Linie und ein Teil ihrer erzeugten Neurone sind Gooseberry-positiv und der Neuroblast NB5-6 generiert unterschiedlich viele Neurone in den Thorakalsegmenten und den Abdominalsegmenten, weswegen dieser in NB5-6T und NB5-6A unterschieden wird (Buenzow und Holmegreen, 1995; Schmidt *et al.*, 1997). Im Segment A8 ist nur ein Zelltyp vorhanden. Interessanterweise variiert die Anzahl der Fuss-Neurone in diesem Segment während der Entwicklung. So sind in früheren Embryonalstadien kurzzeitig drei Neurone pro Hemineuromer und in späteren Stadien nur noch zwei Neurone sichtbar. So exprimiert dieses Neuron nur kurzzeitig Fuss oder wird nur temporär angelegt, um nachfolgend wieder durch Zelltod entfernt zu werden. Durch die Nähe dieser Neurone zu Engrailed-positiven Neuronen (Anhang 6.4), ihrer Lage und Projektionen im Hemineuromer könnte es sich hierbei um Neurone handeln, die der NB4-2 erzeugt. Von diesem NB4-2 ist auch bekannt, dass ein Teil der abstammenden Zellen durch Apoptose entfernt wird (Rogulja-Ortmann *et al.*, 2007). Ab dem Abdominalsegment A7 findet man einen weiteren Zelltyp, der wahrscheinlich von NB4-1 abstammt (persönliche Kommunikation mit Christof Rickert).

Hierbei handelt es sich aber um präliminäre Ergebnisse und weitere Analysen werden benötigt, um eindeutige Aussagen treffen zu können, ob die Neuroblasten NB5-6T, NB4-1 und NB4-2 wirklich für die Erzeugung von Fuss-Neuronen verantwortlich sind und ob noch weitere Neuroblasten beteiligt sind.

3.3 Fuss wird postmitotisch in Neuronen exprimiert, die GABA, ACh oder Glutamat ausschütten

Die Analyse embryonal und larval geborener Fuss-Neurone im ZNS ergab, dass Fuss ausschließlich postmitotisch und im Gegensatz zu Snoo nicht ubiquitär exprimiert ist (Abb. 32 – 34; Fisher *et al.* 2012). Kolokalisation zwischen Fuss und den Markern für Interneurone (Dachshund und Apterous) konnte gefunden werden (Abb. 36 und 37). Ein Teil der Fuss-Neurone ist zudem Spa- und Toy-positiv (Abb. 35 und 48). Keine Expression von Fuss konnte in pMAD-positiven Tv-Neuronen bzw. Motoneuronen beobachtet werden (Abb. 45). Im ZNS handelt es sich bei den Fuss-Neuronen wahrscheinlich nur um Interneurone, da neben Motoneuronen nur sehr wenige sensorische Neurone im ZNS sitzen (Hamada *et al.*, 2008; Miyamoto *et al.*, 2012). Fuss-Neurone schütten die Neurotransmitter Acetylcholin, GABA oder Glutamat aus (Abb. 38) und nach der Entwicklung wird Fuss weiterhin exprimiert (Abb. 49). Außerhalb des ZNS konnte Fuss-Expression in Neuronen des Hypozerebralganglions, Proventrikularganglions und in larvalen und adulten gustatorischen Neuronen nachgewiesen werden. Bei einem Teil der Neurone im PVG und den gustatorischen Neuronen handelt es sich nicht um Interneurone, sondern um sensorische Neurone (Abb. 39 und 55).

Wie Fuss werden die murinen Homologe Corl1 und Corl2 und die humanen Homologe Fussell15 und Fussell18 embryonal in einzelnen, postmitotischen Neuronen des zentralen Nervensystems exprimiert. Corl1, Corl2, Fussell15 und wahrscheinlich auch Fussell18 sind in GABAergen Purkinjezellen und Corl1 in GABAergen dI4 und glutamatergen dI5 Interneuronen exprimiert. Außerhalb des ZNS konnte Corl1- und Fussell18-Expression im Hoden detektiert werden (Arndt *et al.*, 2005; Arndt *et al.*, 2008; Glasgow *et al.*, 2005; Mizuahara *et al.*, 2005; Minaki *et al.*, 2008).

Die Expressionsmuster von Fuss und den murinen bzw. humanen Homologen sind somit prinzipiell sehr ähnlich im ZNS. So beschränkt sich die Expression dieser Proteine auf wenige postmitotische Neurone, die auch unterschiedlichen Populationen angehören und auch unterschiedliche Neurotransmitter exprimieren. In dieser Arbeit wurde nicht

untersucht, ob Fuss im Hoden von *Drosophila melanogaster* exprimiert wird, genauso wenig existieren Daten über die Expression eines humanen oder murinen Homologs in gustatorischen Neuronen.

3.4 Handelt es sich bei den Phänotypen von *Df(4)dCORL* um *loss of function*-Phänotypen von *toy*?

Takaesu *et al.* (2012) haben aufgrund einer RNA-*in-situ*-Hybridisierung angenommen, dass Fuss in den Kenyonzellen während der Entwicklung exprimiert ist. Sie zeigten, dass adulte Fliegen der Defizienz *Df(4)dCORL*, in der *fuss*, *mGluR*, *4e-T*, *cr44030*, *cr45201* und ca. 1,3kb *upstream* von Fuss deletiert sind, unter anderem stark deformierte Pilzkörper aufweisen und die Kenyonzellen während der späten dritten Larvalphase kein EcR1B exprimieren (Abb. 6). Außerdem überleben nur 21% bis ins Adultstadium und von den Überlebenden war die Lebensspanne stark verkürzt. In dieser Arbeit wurde versucht mit Hilfe der Mutante Mi13731 bzw. Fliegen, bei denen die Fuss-Neurone durch die Expression von Reaper entfernt wurden, die Ergebnisse von Takaesu *et al.* (2012) zu replizieren. Mittels Antikörperfärbung konnte nachgewiesen werden, dass Fuss nicht in den Kenyonzellen exprimiert wird (Abb. 41). Adulte Fliegen des Genotyps Mi13731 bzw. UAS-RPR; *fuss*-Gal4 hatten weder verformte Pilzkörper noch zeigten die Kenyonzellen einen Verlust von EcR1B-Expression im späten dritten Larvenstadium (Abb. 43 und 44). Die Fliegen beider Genotypen haben keine erhöhte Sterblichkeit während der Entwicklung und bei Fliegen des Genotyps Mi13731 konnte keine Beeinträchtigung der Lebensdauer festgestellt werden (Abb. 42).

Die Defizienz *Df(4)dCORL* wurde durch Komplementation genetisch charakterisiert. Dazu wurden die Fliegenlinien *sphinx*^{720^{rw}}, *toy*^{h^{dl}} und *PBac{RB}4E-T*^{e02096} verwendet. Auch sind, wie von Takaesu *et al.*, (2012) beschrieben, Fliegen mit Deletionen von *sphinx*, *mGluRa* oder der Transposoninsertion *PBac{RB}4E-T*^{e02096} ohne Einschränkungen lebensfähig. Von den zwei mittlerweile identifizierten RNA-Genen *cr44030* und *cr45201* weist zumindest Mi^{cr44030} keine erhöhte Sterblichkeit während der Entwicklung auf (Russow, 2016). Über *cr45201* kann keine Aussage getroffen werden. Der Verlust der EcR1B-Expression im larvalen Pilzkörper konnte von Takaesu *et al.* (2012) durch einen Knockdown von Fuss mit einem dsRNA-Konstrukt repliziert werden und im mutanten Hintergrund war es möglich, den Verlust der EcR1B-Expression durch eine Überexpression von Fuss zu retten.

Aufgrund dessen stellt sich natürlich die Frage, wieso diese Ergebnisse nicht repliziert werden konnten. Eine Möglichkeit wäre, dass es sich bei Mi13731 nicht um eine vollständige Fuss-Mutante, sondern nur um eine hypomorphe Mutation handelt. In qPCR Experimenten konnten im Schnitt noch 15% Transkript detektiert werden. Dagegen kann aber durch Antikörperfärbung in larvalen Gehirnen von Mi13731-Larven keine Fuss-Expression mehr nachgewiesen werden. Außerdem wurden die Fuss-Zellen auch mit Hilfe der Treiberlinie *fuss-Gal4* ablatiert und dies beeinträchtigt die Fliegen weder in der Entwicklung im Allgemein noch die Pilzkörperentwicklung im Speziellen. Einzige Erklärung wäre, dass, falls Fuss komplett inhibiert wird, ein Morphogen von den Fuss-Neuronen exprimiert wird, welches die Kenyonzellen in ihrer Entwicklung beeinflusst.

Eine andere Möglichkeit ist, dass die Phänotypen der *Df(4)dCORL*-Fliegen falsch interpretiert wurden. Obwohl laut Takaesu *et al.* (2012) eine genetische Komplementation mit *toy^{hdl}* stattfand, bestünde die Möglichkeit, dass ein partielles Fehlen der *toy*-Expression für die beobachteten Phänotypen verantwortlich ist. Wie bereits erwähnt, wurden *upstream* vom *fuss*-Lokus ungefähr 1,3kb deletiert und somit möglicherweise ein *toy*-spezifischer Enhancer, da *toy* ca. 1 kb *upstream* von *Fussel* liegt. Zum Beispiel liegt der Enhancer, der für die Expression von *toy* in der embryonalen Augenanlage zuständig ist, ungefähr 8kb bzw. 3kb vom Transkriptionsstart von *toy* bzw. *fuss* entfernt (Blanco *et al.*, 2010). Des Weiteren befinden sich in einem 4kb großen Abschnitt vor dem *fussB*-Transkriptionsstart Enhancer, die für Expression im Pilzkörper sorgen. Dies konnte festgestellt werden, als durch die Klonierung dieses 4kb großen DNA-Abschnitts versucht wurde, eine *fuss-Gal4*-Linie, genannt *4kb-fuss-Gal4*, zu erzeugen (Abb. 62G). Somit befinden sich in nächster Nähe zu *fuss* *toy*-spezifische Enhancer.

Furukubo-Tokunaga *et al.*, untersuchten die *toy^{hdl}*-Mutante und diese weist auch erhöhte Letalität während der Larvalphase auf. Im späten Puppenstadium sterben bis auf wenige Escaper alle homozygoten *toy^{hdl}*-Individuen. Da Toy neben Dac und Eyeless eine wichtige Rolle bei der Pilzkörperentwicklung spielt, analysierten Furukubo-Tokunaga *et al.* die Pilzkörper von *toy^{hdl}*-Individuen (Kurusu *et al.*, 2000).

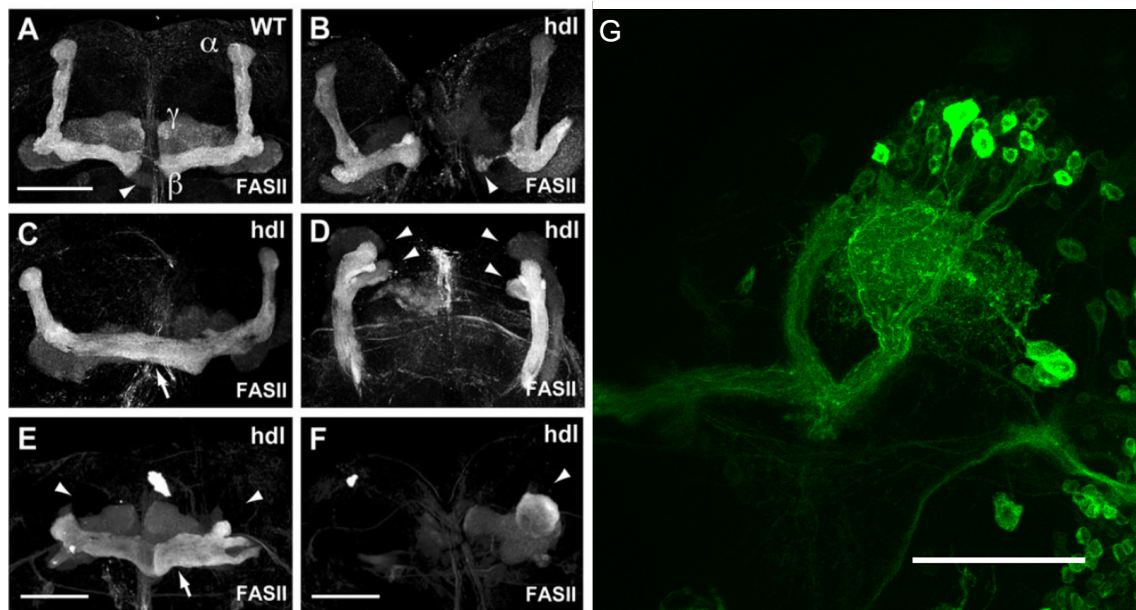


Abbildung 62: *toy^{hdl}*-Mutation führt zu deformierten Pilzkörpern. Im Gegensatz zum wildtypischen Pilzkörper (A), fehlen die β -Loben der *toy^{hdl}*-Mutante teilweise (B) oder sind fusioniert (C). Die dorsalen Loben weisen eine falsche Orientierung auf (D) oder fehlen (E). Bei stark ausgeprägten Phänotypen fehlt der Pilzkörper fast vollständig (F). Die *4kb-fuss*-Gal4-Linie zeigt unter anderem Expression im larvalen Pilzkörper (G). Stacks. Balken entsprechen 50 μ m. (Abb. A - F nach Furukubo-Tokunaga *et al.*, 2014).

Die Pilzkörperaberrationen der *toy^{hdl}*-Mutante sind sehr vielfältig, so kann der Verlust eines Teils des β -Lobus, beider β -Loben oder auch fusionierte β -Loben beobachtet werden. Dorsale Loben zeigten falsche Orientierung, fehlten komplett oder der Pilzkörper war kaum ausgebildet (Abb. 62). Da es sich bei *toy^{hdl}* um ein Nullallel handelt, sind diese Phänotypen zwar um einiges stärker als bei *Df(4)dCORL*, aber im Prinzip dennoch ähnlich zu diesen.

Darüber hinaus ist es schwierig nachzuvollziehen, wie ein Knockdown von Fuss die EcR1B-Expression im Pilzkörper inhibieren und eine Überexpression von Fuss in den Kenyonzellen der Defizienz die EcR1B-Expression retten kann, wenn Fuss in den Kenyonzellen endogen nicht exprimiert ist. Da die Defizienz mir nicht zur Verfügung stand, kann ich nur mutmaßen, dass die in der Defizienz gefundenen Phänotypen auf einen partiellen Verlust der Toy-Expression im Pilzkörper und nicht der Fuss-Expression zurückzuführen sind.

3.5 Fuss ist kein Inhibitor des Dpp-Signalwegs

Fuss interagiert mit Smad4 sowie HDAC1 und kann, falls es in Zellen überexprimiert wird in denen der Dpp-Signalweg aktiv ist, diesen inhibieren. Aufgrund dieser Ergebnisse und der Zugehörigkeit von Fuss zur Ski/Sno-Proteinfamilie wurde Fuss als Inhibitor des Dpp-Signalwegs klassifiziert (Fischer *et al.*, 2012; Kullmann, 2014; Raß, 2012;). Daneben

zeigen auch Arbeiten mit dem humanen Fussel15 oder murinen Corl2, dass diese in Zellkultur einen aktivierten BMP-Signalweg hemmen können (Wang *et al.*, 2011). Neben der Inhibition des Dpp-Signalwegs konnte auch eine negative Regulation einiger Gene, darunter Spa und Toy, nach der Überexpression von Fuss festgestellt werden (Zahn, 2013; Raß, 2012). Da auch in ChIPseq-Daten, die von Embryonen bzw. S2-Zellen generiert wurden, in denen Fuss überexprimiert wurde, eine Bindung von Fuss am Spa-Lokus (Anhang 6.5) gefunden wurde, war Spa ein vielversprechender Kandidat eines Fuss-Zielgens (Meier, 2015, Kullmann, 2014).

In Fuss-Neuronen konnte keine Phosphorylierung von Mad detektiert werden, somit ist in diesen Zellen der Dpp-Signalweg nicht aktiv (Abb. 45). Würde Fuss die Aktivierung des Dpp-Signalwegs unterdrücken, müsste eine Inhibition desselben bereits *upstream* von der Phosphorylierung von Mad stattfinden. So könnte Fuss die Expression von Mad, der Typ-I- oder Typ-II-Rezeptoren negativ regulieren oder die Phosphorylierung von Mad sterisch behindern. Jedoch weisen auch Fuss-Neurone von larvalen Gehirnen von Mi13731-Larven keine Phosphorylierung von Mad auf (Abb. 46). Folglich wirkt Fuss nicht als Inhibitor des Dpp-Signalwegs.

Auf Sparkling konnte auch keine regulatorische Wirkung durch Fuss festgestellt werden. So exprimieren einige Fuss-Neurone im larvalen VNS Spa, die im larvalen Gehirn gelegenen Fuss-Neurone dagegen nicht. Auch bei ausbleibender Fuss-Expression ändert sich das Spa-Expressionsmuster nicht (Abb. 47 und 48).

In Zellen, in denen der Dpp-Signalweg aktiv ist, wirkt die Überexpression von Fuss durch seine Interaktion mit Med und HDAC1 möglicherweise hemmend auf diesen (Fischer *et al.*, 2012; Kullmann, 2014). Dadurch könnte Fuss ähnlich wie Ski und Sno einen transkriptionsreprimierenden Komplex in die Nähe der Zielgene des Dpp-Signalwegs bringen (Zeglinski *et al.*, 2015). Interessanterweise führt die Überexpression von Fuss fast immer zu drastischen Phänotypen, unabhängig davon, ob der Dpp-Signalweg in diesen Zellen aktiv ist oder nicht (Illic, 2015; Raß, 2012). Vielleicht hängt die Funktionsweise von Fuss hauptsächlich von der Präsenz von HDAC1 und Medea ab. Dies würde zum einen erklären, wieso es dennoch zu Phänotypen kommt, wenn Fuss in Zellen, in denen der Dpp-Signalweg inaktiv ist, überexprimiert wird und zum anderen, wieso es in den endogenen Fuss-Neuronen keine Kolo-kalisation zwischen pMad und Fuss gibt, da Fuss unabhängig vom Dpp-Signalweg funktioniert. Eine weitere Option wäre, dass Fuss in Neuronen exprimiert ist, in denen der Activin- β -Signalweg angeschaltet ist. In

Arbeiten im murinen und humanen System konnte eine Interaktion von Fuss-Homologen mit Smad3, dem Smad2-Homolog in *Drosophila melanogaster*, nachgewiesen werden (Arndt *et al.*, 2005; Takaesu *et al.*, 2012). Da keine Marker für einen aktivierten Activin- β -Signalweg zur Verfügung standen, konnte nicht untersucht werden, ob Interaktion zwischen diesem und Fuss besteht.

Insgesamt zeigen diese Experimente, dass Rückschlüsse auf die endogene Funktion durch Überexpressionsexperimente nicht möglich sind, da durch das Zusammenspiel von Fuss mit Medea und HDAC1 der Chromatinstatus des zu inhibierenden Zielgens eine wichtige Rolle spielt und dieses Zielgen nur inhibiert werden kann, wenn es sich nicht in einem off-Zustand befindet und dieser Chromatinstatus kann von Zelle zu Zelle unterschiedlich sein (Geisler und Paro; 2015). Aufgrund dessen könnten in unterschiedlichen Fuss-Neuronen unterschiedliche Gene durch den Med-Fuss-HDAC1-Komplex reguliert werden. Auch die Zusammensetzung des Med-Fuss-HDAC1-Komplex könnte innerhalb einer Zelle variieren, denn neben der oftmals in der Literatur beschriebenen Inhibierung des TGF- β - bzw. BMP-Signalwegs wirken Ski und Sno mit nukleären Hormonrezeptoren zusammen. So werden Ski und Sno für die transkriptionshemmende Wirkung des Thyroidhormonrezeptors benötigt und Sno interagiert mit dem Hormonrezeptor Östrogenrezeptor- α (Band und Laiho, 2012; Nomura *et al.*, 1999).

3.6 Fuss reguliert teilweise seine eigene Expression

Ein Gen konnte identifiziert werden, dessen Expression zumindest in manchen Neuronenpopulationen durch Fuss positiv reguliert wird. Bei diesem Gen handelt es sich um *fuss* selbst. Wie gezeigt werden konnte, ist die Anzahl der GFP-positiven Neurone im ZNS von homozygoten Mi13731-Larven vor allem im VNS und in einem Cluster im Gehirn verringert (Abb. 28). Dies lässt den Schluss zu, dass für die Aufrechterhaltung der *fuss*-Expression Fuss selbst benötigt wird. Dass diese Zellen aufgrund fehlender Fuss-Expression durch Apoptose entfernt werden, konnte widerlegt werden, aber ob diese positive Feedbackschleife direkt durch Fuss oder indirekt durch andere Gene, die durch Fuss kontrolliert werden, aufrechterhalten wird, ist nicht klar (Abb. 40). Somit wird Fuss nicht nur in unterschiedlichen Neuronenpopulationen exprimiert, sondern wird dessen Expression in diesen auch unterschiedlich reguliert.

3.7 Mi13731-Fliegen weisen adult vielfältige Phänotypen auf

In adulten Fliegen kann weiterhin Fuss-Expression beobachtet werden. Diese Neurone innervieren unter anderem die Medulla, Lobula und Lobulaplatte (Abb. 49). Jedoch

handelt es sich dabei nicht um Uhrneurone, deswegen ist es wenig überraschend, dass in Mi13731-Fliegen die circadiane Rhythmik nicht gestört ist (Abb. 51). Dagegen ist die Siesta der Mi13731-Fliegen stark verlängert und die Aktivität der Fliegen während der Siesta war verringert (Abb. 52).

Die Siesta wird in den Uhrneuronen durch alternatives Spleißing von *period* kontrolliert. Dieses alternative Spleißing hängt von der Tageslänge und von der Temperatur ab (Wijnen und Young, 2008). Es konnte bereits gezeigt werden, dass der temperatursensitive Ionenkanal TRPA1 und einige thermosensorische Neurone eine wichtige Rolle beim Input der circadianen Uhr und somit der Regulation der Siesta spielen (Das *et al.*, 2016; Roessingh *et al.*, 2015).

Da es sich bei den Fuss-Neuronen nicht um Uhrneurone handelt, könnte ein Teil der Fuss-Interneurone als Übermittler des thermosensorischen Inputs für die Uhrneurone dienen oder Fuss-Neurone könnten selbst thermosensorische Neurone sein. Bei den identifizierten, thermosensorischen Neuronen handelt es sich unter anderem um die serotonergen AC-Neurone (Shih and Chiang, 2011; Das *et al.*, 2016). Zumindest in der Larve konnte keine Kolokalisation zwischen *ddc*-Gal4, einem Marker für serotonerge und dopaminerge Neurone, und Fuss festgestellt werden, somit sind die AC-Neurone wahrscheinlich keine Fuss-Neurone. Über die anderen thermosensorischen Neurone kann keine Aussage getroffen werden. Eine weitere, aber unwahrscheinliche Möglichkeit besteht darin, dass die Fuss-Neurone aufgrund der vielen Projektionen im optischen Lobus das elektrische Signal von den Photorezeptoren weiterverarbeiten und unter anderem zu den Uhrneuronen weiterleiten. Bisher ist jedoch bekannt, dass der visuelle Input zum einen von den Cryptochrom-positiven Uhrneuronen und zum anderen vom Komplexauge, dem Bolwigorgan und dem Hofbauer-Buchner-Äuglein herrührt. Während das Bolwigorgan und HB-Äuglein direkten Kontakt zu den PDF-Neuronen haben, wird das Signal von den Photorezeptoren über Interneurone zu den PDF-Neuronen geleitet (Yoshii *et al.*, 2015). Ebenfalls könnte der Output der Uhr modifiziert werden, falls Fuss-Neurone an der Weiterleitung und Verarbeitung des Signals von den Uhrneuronen zu den Motoneuronen beteiligt sind. Dass Fuss-Neurone mit Uhrneuronen kommunizieren, ist aufgrund der Projektionen durchaus denkbar, da diese ähnlich verlaufen wie die Axone der l-LN_v-Neurone und ein Teil der Projektionen der Fuss-Neurone in der Nähe der dorsalen Uhrneurone liegt (Abb. 50 und 51). Es wurde bereits versucht mit dem GRASP-System Kontakte zwischen den Fuss-Neuronen und

Uhrneuronen aufzudecken, aber aufgrund der räumlichen Nähe und der Beschaffenheit der Technik, führte dies dazu, dass nicht einzelne Synapsen, sondern komplette Axone gefärbt wurden (Feinberg *et al.*, 2008). Mittlerweile ist ein verbessertes GRASP-System erschienen, welches nur noch Synapsen zwischen zwei Neuronen visualisiert. Mit Hilfe dieses Systems sollte der Sachverhalt zukünftig geklärt werden können (Macpherson *et al.*, 2015).

Da Fuss-Interneurone möglicherweise mit Motoneuronen kommunizieren, wurde die Klettergeschwindigkeit von unterschiedlich alten Mi13731-Fliegen analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei zehn Tage alten Mi13731-Fliegen die Klettergeschwindigkeit drastisch abnimmt (Abb. 53). Aber kein Verlust von Fuss-Neuronen konnte mit zunehmendem Alter beobachtet werden (Abb. 54). Interessanterweise war es aber nicht so, dass die Fliegen nicht mehr schnell klettern konnten, sondern vielmehr die Motivation zum Klettern fehlte. Denn vereinzelt zeigten Fliegen in einem der drei Läufe fast wildtypische Geschwindigkeit. Deswegen ist vorstellbar, dass die Weiterleitung von Signalen durch das Fehlen von Fuss beeinträchtigt wird, da die Expression von Fuss bereits während der Entwicklung ausbleibt und womöglich die Differenzierung dieser Neurone gestört ist. Dieser Effekt verstärkt sich mit zunehmendem Alter und Fussel erfüllt demnach auch eine Funktion bezüglich der Aufrechterhaltung der Integrität dieser Neurone.

Dies ist auch im Vergleich mit den Homologen im Vertebraten interessant. Denn im humanen System wird Fussel 15 und im murinen System Corl1 und Corl2 unter anderem in Purkinjezellen des Gehirns exprimiert. Ein Verlust oder Beeinträchtigung dieser Zellen korreliert mit Ataxien. Weiter konnte eine Häufung eines SNPs zwischen *MAP2K5* und *Fussel15* bei Patienten, die am Restless-Legs-Syndrom leiden, gefunden werden (Anzilotti *et al.*, 2015; Arndt *et al.*, 2007; Barclay *et al.*, 2001; Nakatani *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2011).

Ob Fuss-Neurone direkt mit Motoneuronen in Verbindung stehen und um welche Fuss-Neurone es sich dabei handeln könnte, ist nicht bekannt. Aber möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der verminderten Kletterfähigkeit der Mi13731-Fliegen und den im Menschen durch beeinträchtigte Purkinjezellen ausgelöste Ataxien oder dem Restless-Legs-Syndrom. Purkinjezellen zeigen in Corl2-Mutanten verminderte Verzweigungen der Dendriten. Zwar existiert in *Drosophila melanogaster* kein Äquivalent zu den Purkinjezellen, aber die Dendriten oder Axone der Fuss-mutanten

Neurone könnten auch verändert sein. So führt ein Knockdown von Snoo in sensorischen Neuronen der Klasse-4 zu verkürzten und weniger verzweigten Dendriten (Iyer *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2011).

Die Expression von Fuss konnte in 31 bis 34 gustatorischen Neuronen beobachtet werden. Dabei innervierte ein Fuss-positives gustatorisches Neuron jeweils eine gustatorische Sensille. Aufgrund des Projektionsmusters im Subösophagalganglion, welches dem bitter registrierenden, gustatorischen Neuron entsprach, wurde analysiert, ob Fuss-mutante Mi13731-Fliegen bzw. Fliegen, bei denen die Fuss-Neurone ablatiert wurden, eine verminderte Fähigkeit aufwiesen, den Bitterstoff Koffein zu detektieren. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Fliegen, die keine Fuss-Neurone mehr besaßen, fast ausschließlich die Lösung mit dem Bitterstoff zu sich nahmen. Mi13731-Fliegen wählten die Lösung mit dem Bitterstoff fast im gleichen Maße wie die Zuckerlösung. Somit ist dies ein erster Hinweis, dass zumindest ein Teil der Fuss-exprimierenden, gustatorischen Neurone der Detektion von Bitterstoffen dient und die Rezeption von Koffein in Fuss-Mutanten verschlechtert ist (Abb. 55).

Ob noch weitere Fuss-Neurone, die im SOG lokalisiert sind, an der Verarbeitung der Geschmacksstoffe beteiligt sind, ist unklar. Da die gustatorischen Neurone mittlerweile sehr gut charakterisiert sind, sollte es relativ einfach sein, durch Verwendung unterschiedlicher Gal4-Linien die Fuss-exprimierenden gustatorischen Neurone zu identifizieren (Delventhal und Carlson, 2016). Für die Analyse der Funktion von Fuss stellen die gustatorischen Neurone ein attraktives Modell dar, da diese gut beschrieben und einfach zugänglich sind. Weiter können mittels einfacher Verhaltensversuche Störungen der gustatorischen Neurone leicht verfolgt werden.

Zusammengefasst lassen sich aufgrund dieser Verhaltensversuche noch keine konkreten Aussagen über die Funktion von Fuss treffen, aber dies zeigt zumindest, dass Fuss für die Differenzierung und Funktion der Neurone von wichtiger Bedeutung ist, da bei fehlender Expression Verhaltensweisen gestört sind, die zwar in einer kontrollierten Laborumgebung nicht von großer Bedeutung sind, welche aber in der Natur Leben oder Tod bedeuten können.

3.8 Fuss macht Zellen unempfindlich für das Dpp-Morphogen

In der Augenscheibe können Fuss-überexprimierende Klone nicht mehr auf das antiproliferative Dpp-Signal reagieren. Dadurch kann die bestehende Wingless-Expression nicht inhibiert werden. Diese Zellen differenzieren daraufhin nicht und

proliferieren weiter. Die anhaltende Proliferation führt schließlich zu Auswüchsen aus den larvalen Augenscheiben bzw. aus den adulten Komplexaugen.

Eine ähnliche Funktionsweise konnte bei Ski und Sno in Tumoren beobachtet werden. Ski und Sno sind Inhibitoren des TGF- β -Signalwegs, welcher selbst proliferationshemmend wirkt. Folglich ist die erhöhte Expression von Ski oder Sno in Haut- oder Speiseröhrentumoren mitverantwortlich für das Wachstum und deren Progression. Analog zu den Fuss-überexprimierenden Klonen sind diese Tumorzellen nicht mehr empfänglich für die antiproliferativen Effekte von TGF- β (Reed *et al.*, 2005; Takahata *et al.*, 2009).

Vom molekularen Prinzip her scheint Fuss in den Klonen Ski und Sno in Tumoren zu entsprechen. So verhindern diese, dass Zellen antiproliferative Signale wahrnehmen und sorgen somit für eine Progression des Tumors bzw. eine anhaltende Teilung der Zellen im Falle von Fuss. Die Funktion von Ski und Sno ist sehr kontextspezifisch, so können diese sowohl die Rolle eines Onkogens als auch eines Tumorsuppressors einnehmen. Dies konnte auch bei Fuss beobachtet werden, führte die Überexpression von Fuss in Klonen in den Augenscheiben zu erhöhter Proliferation, während die Überexpression von Fuss im Flügel zu einer verminderten Flügelgröße führte. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Dpp hier nicht wie in der Augenimaginalscheibe die Proliferation hemmt, sondern für diese benötigt wird. Dadurch resultiert dann eine Inhibition des Dpp-Signalwegs durch Fuss in der verminderten Flügelgröße (Burke und Basler, 1996; Fischer *et al.*, 2012; Martín-Castellanos und Edgar, 2003).

Im Falle der Auswüchse aus den Augenscheiben kann aber nicht von Tumoren gesprochen werden. Denn das Wachstum ist zeitlich begrenzt und wird wahrscheinlich während der pupalen Phase gestoppt. Während dieser führt Wg-Expression in den äußersten Ommatidien zu deren Abbau durch programmierten Zelltod. Bei diesem Vorgang bleiben nur die sekundären und tertiären Pigmentzellen zurück, die danach den Pigmentrand bilden (Lin *et al.*, 2004b). Da die Fuss-überexprimierenden Klone ebenfalls Wg exprimieren, könnte das Wachstum durch Apoptose gestoppt werden, aber der genaue Grund ist nicht bekannt.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass Fuss für die Differenzierung von Neuronen benötigt wird und auch adult eine Rolle in diesen Neuronen spielt. Ähnlich wie im murinen bzw. humanen System wird Fuss während der Entwicklung nur in einzelnen, postmitotischen Neuronen des Nervensystems exprimiert und die Expression

von Fuss kann im adulten Stadium weiterhin beobachtet werden. Fuss-mutante Fliegen weisen eine verringerte Aktivität während der Siesta, eine altersabhängige Reduzierung der Klettergeschwindigkeit und eine verschlechterte Rezeption von Koffein auf. Entgegen bisheriger Annahmen ist Fuss nicht an der Entwicklung des Pilzkörpers beteiligt und es handelt sich bei Fuss endogen nicht um einen Inhibitor des Dpp-Signalwegs, sondern kann diesen nur inhibieren, falls er in Zellen, in denen dieser Signalweg aktiv ist, überexprimiert wird. Aufgrund der Dpp-Signalweg inhibierenden Fähigkeit von Fuss, war es möglich, in Augenscheiben durch Überexpression von Fuss Auswüchse zu erzeugen. Auch die molekulare Funktionsweise von Fuss in den Auswüchsen entspricht im Prinzip der von Ski und Sno in Haut und Speiseröhrentumore, da diese Proteine die Zellen unempfindlich für TGF- β machen. Die Ergebnisse dieser und weiterer am Lehrstuhl verfassten Arbeiten zeigen, dass die molekulare Funktionsweise und die eingeschränkte Expression von Fuss konserviert ist. Somit kann die Analyse von Fuss in *Drosophila melanogaster* dazu beitragen, die molekulare Funktion dieser Proteine besser zu verstehen. Dennoch sollte auf Überexpressionen von Fuss verzichtet werden, denn dadurch können keine Rückschlüsse auf die endogene Funktion gezogen werden. So sollte versucht werden mittels DamID oder TADA Fuss-regulierte Gene zu identifizieren und mit Hilfe dieser Daten die Auswirkungen von fehlender Fuss-Expression auf die Neurone besser untersuchen und verstehen zu können.

4 Material

4.1 Fliegenstämme

Die Fliegen wurden in Gläsern mit Nahrungsbrei bestehend aus 0,8% Agar, 2,2% Zuckerrübensirup, 8,0% Malzextrakt, 1,8% Bierhefe, 1,0% Sojamehl, 8,0% Maismehl sowie 0,3% Nipagin als Fungizid bei 18°C beziehungsweise 25°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 65% gehalten. Die administrierte Beleuchtung simulierte einen 12h-Hell/12h-Dunkel-Rhythmus (LD). Sofern nicht anders erwähnt, fanden die Analysen mit Fliegen, die auf 25°C gehalten wurden, statt.

Genotyp	Kürzel	Herkunft
<i>fuss-Gal4 (4kb)</i>	<i>4kb-fuss-Gal4</i>	diese Arbeit
<i>y¹ w¹¹¹⁸; P{GawB}ap^{md544}/CyO</i>	<i>ap-Gal4</i>	<i>Bloomington Stock Collection</i> #3041
<i>ap[C]-tau lacZ[2.1] on III</i>	<i>ap-LacZ</i>	AG Technau
<i>CantonS</i>	<i>CantonS</i>	Stammsammlung
<i>w[*]; P{ChAT-GAL4.7.4}19B P{UAS-GFP.S65T}Myo31DF^{T2}</i>	<i>ChAT-Gal4</i>	<i>Bloomington Stock Collection</i> #6793
<i>w¹¹¹⁸; P{Ddc-GAL4.L}4.3D</i>	<i>Ddc-Gal4</i>	<i>Bloomington Stock Collection</i> #7010
<i>w[*]; P{GawB}dimm⁹²⁹ crc⁹²⁹</i>	<i>dimm-Gal4</i>	<i>Bloomington Stock Collection</i> #25373
<i>w[*]; CyO/Sco; In(4)ci^D, ci^D pan^{ciD}/Dp(2;4)ey^D, Alp^{eyD}: ey^D</i>	Doppelbalancer	diese Arbeit
<i>w[*]; CyO/Sco; TM3/D3</i>	Doppelbalancer	Stammsammlung
<i>w[*]; CyO/Sco; TM6B/MKRS</i>	Doppelbalancer	Stammsammlung

Genotyp	Kürzel	Herkunft
w^* ; <i>CyO/Sp</i> ; <i>TM6B/D3</i>	Doppelbalancer	Stammsammlung
w^* ; <i>TM3/D3</i> ; <i>In(4)ci^D</i> , <i>ci^D</i> <i>pan^{ciD}/Dp(2;4)ey^D</i> , <i>Alp^{eyD}</i> : <i>ey^D</i>	Doppelbalancer	diese Arbeit
<i>cn^l P{PZ}dpp¹⁰⁶³⁸/CyO</i> ; <i>ry⁵⁰⁶</i>	<i>dpp</i> -LacZ	<i>Bloomington Stock Collection</i> #12379
<i>P{GawB}elav^{C155}</i>	<i>elav</i> -Gal4	<i>Bloomington Stock Collection</i> #458
<i>P{hsFLP}22, w^*, y^l</i>	Flp22	<i>Bloomington Stock Collection</i> #8862
<i>y[1] w[*]</i> ; <i>P{w[+mC]=GAL4-Act5C(FRT.CD2).P}S</i>	FRT-actin-Gal4	<i>Bloomington Stock Collection</i> #4780
<i>fuss-Gal4(Mi13731)</i>	<i>fuss</i> -Gal4-Linie; Gal4 Insertion in Mi13731	diese Arbeit
<i>P{Gad1-GAL4.3.098}2/CyO</i>	<i>Gad1</i> -Gal4	<i>Bloomington Stock Collection</i> #51630
<i>ry⁵⁰⁶ P{PZ}hh^{P30}</i>	<i>hh</i> -LacZ	<i>Bloomington Stock Collection</i> #5530
<i>y^l; Mi{MIC}fuss^{Mi13731}</i>	Mi13731; Fuss- Mutante	<i>Bloomington Stock Collection</i> #60860
<i>y^l w^*</i> ; <i>P{lacW}mirr^{cre2}/TM3</i> , <i>Sb^l</i>	<i>mirr</i> -LacZ	<i>Bloomington Stock Collection</i> #10880
w^* ; <i>P{GawB}ey^{OK107}/In(4)ci^D</i> , <i>ci^D panci^D sv^{spa-pol}</i>	<i>OK107</i> -Gal4	<i>Bloomington Stock Collection</i> #854
w^{1118} ; <i>P{GawB}VGlut^{OK371}</i>	<i>OK371</i> -Gal4	<i>Bloomington Stock Collection</i> #26160
w^* ; <i>P{Tdc2-GAL4.C}2</i>	<i>Tdc2</i> -Gal4	<i>Bloomington Stock Collection</i> #9313

Genotyp	Kürzel	Herkunft
$y^l w^*$; $P\{UAS-mCD8::GFP.L\}LL5$	UAS-CD8-GFP; Zellmembran lokalisiert	<i>Bloomington Stock Collection</i> #5137
w^* ; $P\{UAS-mCD8.ChRFP\}2$	UAS-CD8-RFP; Zellmembran lokalisiert	<i>Bloomington Stock Collection</i> #27391
w^* ; $P\{UAS-mCD8.ChRFP\}3$	UAS-CD8-RFP; Zellmembran lokalisiert	<i>Bloomington Stock Collection</i> #27392
<i>UAS-Fuss-GFP (II)</i>	<i>UAS-Fuss-GFP</i>	Schmittlein, 2012
w^{1118} ; $P\{UAS-fussel5\}$ (on II)	UAS-FussB	Edenharter, 2010
w^* ; $P\{w[+] UAS-GFP\}$ on II	UAS-GFP; Cytoplasma lokalisiert	Stammsammlung
w^* ; $P\{w[+] UAS-GFP\}$ on II	UAS-GFP.nls; Zellkern lokalisiert	Stammsammlung
w^{1118} ; $P\{UAS-rpr.C\}14$	UAS-RPR	<i>Bloomington Stock Collection</i> #5824
$y^l w^{67c23}$; <i>Odalex47/CyO</i> , $P\{enI\}wg^{en11}$	wg-LacZ	<i>Bloomington Stock Collection</i> #4373
w^{1118}	Wildtyp mit <i>white</i> Mutation	Stammsammlung
$y^l w^{1118}$; $In(4)ci^D$, ci^D $pan^{ciD}/Dp(2;4)ey^D$, Alp^{eyD} : ey^D	yw; Ey^D/Ci^D	diese Arbeit

Tabelle 1: Auflistung verwendeter Fliegenstämme

4.2 Bakterienstämme

Bezeichnung	Herkunft	Verwendung
Hitzeschockkompetente <i>E. coli</i> -Zellen (DH5alpha)	<i>ThermoFisher</i>	Hitzeschocktransformation für <i>Gateway cloning</i>
Hitzeschockkompetente <i>E. coli</i> -Zellen (XL1-Blue)	<i>Stratagene</i>	Hitzeschocktransformation für <i>TA cloning</i>

Rosetta2 TM	Novagen	Expression von Proteinen
------------------------	---------	--------------------------

Tabelle 2: Auflistung verwendeter Bakterienstämme und Zellkulturen

4.3 Medien

Medium	Zusammensetzung	Anwendung
Apfelagarplatte	600ml H ₂ O mit 14g Agarose aufkochen und auf 60°C halten; 200ml Apfelsaft mit 20g Saccharose vereinen und auf 60°C erwärmen; 3g Nipagin in 20ml Ethanol lösen. Alle drei Lösungen vereinigen.	Eiablageplatten
LB ₀	10g Bacto-Trypton; 10g NaCl; 5g Bacto-Yeast Extract; 0,6ml 5M NaOH; ad 1l H ₂ O; autoklavieren	<i>E. coli</i> -Vollmedium
LB ₀ -Platten	LB ₀ mit 10g Bacto-Agar	<i>E. coli</i> -Vollmediumsplatten
LB _{Amp}	100µg/ml Ampicilin zu LB ₀	<i>E. coli</i> -Selektionsmedium
LB _{Amp} -Platten	100µg/ml Ampicillin in steriles LB ₀ -Platten-Medium	<i>E. coli</i> -Selektionsplatten
LB _{Camp}	34µg/ml Chloramphenicol zu LB ₀	<i>E. coli</i> -Selektionsmedium
LB _{Camp} -Platten	34µg/ml Chloramphenicol in steriles LB ₀ -Platten-Medium	<i>E. coli</i> -Selektionsplatten
LB _{Kan}	50µg/ml Kanamycin zu LB ₀	<i>E. coli</i> -Selektionsmedium
LB _{Kan} -Platten	50µg/ml Kanamycin in steriles LB ₀ -Platten-Medium	<i>E. coli</i> -Selektionsplatten

Tabelle 3: Auflistung verwendeter Medien

4.4 Vektoren

Bezeichnung	Hersteller	Anwendung
1325; pBS-KS-attB1-2-GT-SA-GAL4-Hsp70pA	Bellen und Venken	GAL4-gene trap-Plasmid für RMCE in MiMIC-Linien
pBPGAL4.2Uw-2	Pfeiffer <i>et al.</i> , 2010	Destination-Vektor für Gateway-Klonierung zur Erzeugung von Gal4-Linien

pDonR221	<i>ThermoFisher Scientific</i>	Entry-Vektor für Gateway-Klonierung
pGEM®-T Easy	<i>Promega</i>	Subklonierung von PCR-Produkten
pGEX-4T3	<i>GE Healthcare Life Sciences</i>	<i>E. coli</i> Expressionsvektor; c-terminaler GST-Tag
pQE60	<i>Qiagen</i>	<i>E. coli</i> Expressionsvektor; c-terminaler His-Tag

Tabelle 4: Auflistung verwendeter Vektoren

4.5 Oligonukleotide

Bezeichnung	5'→3'- Sequenz	Annealing-temperatur	Anwendung
RP49for	CCAAGGACTTCATCCGCC ACC	55°C	Amplifikation des <i>housekeeping</i> -Gens für qPCR
RP49rev	GCGGGTGCGCTTGTTCTGA TCC		Amplifikation des <i>housekeeping</i> -Gens für qPCR
Fussb/d qPCR fw	ATTAGGTGACACTATAG	55°C	qPCR
Fussb/d qPCR rv	TAATACGACTCACTATAG GG		qPCR
M13 fw	GTGCCAACACCAGTTCAG A	55°C	Sequenzier-primer für M13
M13rv	GTGCAGGACTCTATCGTTC C	55°C	Sequenzier-primer für M13
Fuss4kb GW fw	GGGGACAAGTTTGTACAA AAAAGCAGGCTTCGATTA CCCATCCTTACATTAC	60°C	GW Primer für die Amplifikation von 4kb <i>upstream</i> von FussB
Fuss4kb GW rv	GGGGACCACTTTGTACAA GAAAGCTGGGTCCAAGTT CCGTTTAGATTTCATT		GW Primer für die Amplifikation

Bezeichnung	5'→3' - Sequenz	Annealing-temperatur	Anwendung
			von 4kb <i>upstream</i> von FussB
694 Seq opt-Fuss Fw	CATTCACGCCTGGGAAGA TGTTA	55°C	Sequenzier- primer für fuss opt
Fuss-GST fw	GCCCATATGATGGACCTG AACGAAAAC	56°C	Amplifikation von Fuss für GST <i>tagging</i>
Fuss-GST rv	GCCCTCGAGTTACACCAG GCTATTTTT		Amplifikation von Fuss für GST <i>tagging</i>
Fuss-frag-His fw	CCATGGAAAGCACCCGTA CCGAT	58°C	Amplifikation von Fuss für His <i>tagging</i>
Fuss-frag-His rv	AGATCTCAGTTCAGCTG ATCTTCGG		Amplifikation von Fuss für His <i>tagging</i>

Tabelle 5: Auflistung verwendeter Oligonukleotide

4.6 Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anwendung
Alkali-SDS-Lösung	200mM NaOH; 1% SDS	DNA-Miniprep
BrdU-Inkubationslösung	0,2mg BrdU; 100µl S2 Schneiderzellmedium; 900µl PBS	BrdU- Proliferationsanalyse
Coomassie-Entfärbelösung	200ml methanol; 100ml Eisessig; 700 ml ddH ₂ O	Entfärben von SDS- Polyacrylamidgele
Coomassie-Färbelösung	1g Coomassie R250; 100ml Eisessig; 400ml Methanol 500ml ddH ₂ O	Färben von SDS- Polyacrylamidgele
DNA-Denaturierungslösung	2M HCl in PBST(0,5%)	BrdU- Proliferationsanalyse
Elektrophoresepuffer (5x)	150g Tris; 720g Glycin; 250ml 20% SDS; ad 5ml H ₂ O	<i>Western Blot</i>
Elutionspuffer	PBS mit 1M Imidazol	Elution

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anwendung
Gel-Ladepuffer (6x)	0,001M EDTA; 50% Glycerin; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol	Agarosegelelektrophorese
GTE-Puffer	50 mM Glukose; 25 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA	Plasmid-Minipräparation
Injektionspuffer (10x)	5mM KCL; 0,1mM NaPhosphatpuffer (pH 6,8)	Keimbahntransformation
KAc	5M KAc	Plasmid-Minipräparation
Lämmli-Puffer (4x)	2,4ml 1M Tris pH 6,8; 0,8g SDS; 4ml 100% Glycerol; 0,01% Bromphenolblau; 1ml β -Mercaptoethanol; 2,8ml Wasser	<i>Western Blot</i>
<i>Low salt buffer</i> (10x)	200mM Tris/HCl pH 8,75; 10mM KCl; 100mM $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$; 20mM MgSO_4 ; 1mg/ml BSA; 1% Triton X-100	PCR
Natriumphosphatpuffer pH5,8	7,9ml 1M Na_2HPO_4 ; 92,1ml 1M NaH_2PO_4	Proteinaufreinigung
PBS	137mM NaCl; 2,68mM KCl; 10,14mM Na_2HPO_4 ; 1,76mM KH_2PO_4	Antikörperfärbung Proteinaufreinigung
Puffer B	100mM NaH_2PO_4 , 10mM Tris-HCl, 8M Urea; pH 8	Proteinaufreinigung
PBST (0,1%)	PBS mit 0,1% Triton X-100	Antikörperfärbung
PBST (0,5%)	PBS mit 0,5% Triton X-100	Antikörperfärbung
PFA (8%)	0,8g Paraformaldehyd; 100 μ l 1M NaOH; 1ml 10xPBS; auf 40ml H_2O auffüllen; pH 7,2 mit 1M HCl	Fixierung
PCB	6M Harnstoff, 10% DDT, 0,01 % Bromphenolblau, 10 mM NaPO_4 pH 7.2, 210 μ l Mercaptoethanol	Proteinextraktion

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anwendung
SDBB	5,82g Tris; 2,93g Glycin; 0,2l Methanol; 1,875ml 20% SDS; ad 1l H ₂ O	<i>Western Blot</i>
TAE (50x)	2M Tris/Acetat pH 8,0 50mM EDTA	Agarosegelelektrophorese
TBS (5x)	6g Tris; 44g NaCl; ad 1l H ₂ O	<i>Western Blot</i>
TBST (5x)	5x TBS mit 5ml Tween-20	<i>Western Blot</i>

Tabelle 6: Auflistung verwendeter Lösungen

4.7 Antikörper

Antikörper	Antigen	Tier	Marker	Verdünnung	Herkunft
1D4	FasciclinII	Maus, monoklonal		IF: 1:10	<i>DSHB</i>
Ab112	Thyrosin- hydroxylase	Kaninchen, polyklonal		IF: 1:200	<i>Abcam</i>
2B10	Cut	Maus, monoklonal		IF: 1:50	<i>DSHB</i>
41D10	pMAD	Kaninchen, polyklonal		IF: 1:200	<i>DSHB</i>
4D9	Engrailed	Maus, monoklonal		IF: 1:20	<i>DSHB</i>
7E8A10	Elav	Ratte, monoklonal		IF: 1:50	<i>DSHB</i>
8D12	Repo	Maus, monoklonal		IF: 1:50	<i>DSHB</i>
AD4.4	EcR1B	Maus, monoklonal		IF: 1:20	<i>DSHB</i>
anti-Eve	Even skipped	Maus, monoklonal		IF: 1:20	<i>DSHB</i>
anti-FussT1	Fuss	Kaninchen, polyklonal		IF: 1:200 WB: 1:2000	diese Arbeit
anti-FussT2	Fuss	Kaninchen, polyklonal		IF: 1:200 WB: 1:2000	diese Arbeit
anti-GFP	GFP	Kaninchen, polyklonal		IF: 1:1000	<i>Invitrogen</i>

Antikörper	Antigen	Tier	Marker	Verdünnung	Herkunft
				WB: 1:2000	
anti-GFP	GFP	Ziege, polyklonal		IF: 1:200	<i>Rockland</i>
anti-HisTag	HisTag	Maus, monoklonal		WB: 1:1000	<i>Quiagen</i>
anti-Kaninchen IgG	Kaninchen- IgG (H+L)	Ziege, polyklonal	Alexa Fluor 800	1:2500	<i>Rockland</i>
anti-Maus IgG	Maus-IgG	Ziege, polyklonal	Alexa Fluor 488	1:200	<i>Invitrogen</i>
anti-Maus IgG	Maus-IgG (H+L)	Ziege, polyklonal	Alexa Fluor 594	1:200	<i>Invitrogen</i>
anti-Maus IgG	Maus-IgG (H+L)	Ziege, polyklonal	Alexa Fluor 647	1:200	<i>Invitrogen</i>
anti-Kaninchen IgG	Kaninchen- IgG (H+L)	Ziege, polyklonal	Alexa Fluor 594	1:200	<i>Invitrogen</i>
anti-Kaninchen IgG	Kaninchen- IgG (H+L)	Ziege, polyklonal	Alexa Fluor 488	1:200	<i>Invitrogen</i>
anti- Meerschweinchen IgG	Meerschweinchen-IgG (H+L)	Ziege, polyklonal	Alexa Fluor 555	1:200	<i>Invitrogen</i>
anti-Maus IgG	Maus-IgG	Ziege, monoklonal	Alexa Fluor 680	1:10000	<i>Invitrogen</i>
anti-Ratte-IgG	Ratte-IgG (H+L)	Ziege	Alexa Fluor 555	1:200	<i>Invitrogen</i>
anti-Spa	Sparkling	Kaninchen, polyklonal		IF: 1:50	M. Noll
anti-Toy	Twin of eyeless	Meerschwein- chen, polyklonal		IF: 1:200	U. Walldorf
anti-Vrille	Vrille	Meerschwein- chen, polyklonal		IF: 1:3000	C. Helfrich- Förster, Würzburg

Antikörper	Antigen	Tier	Marker	Verdünnung	Herkunft
eya10H6	Eyes absent	Maus, monoklonal		IF: 1:50	<i>DSHB</i>
G3G4	BrdU	Maus, monoklonal		IF: 1:100	<i>DSHB</i>
JIE7	β -Galaktosidase	Kaninchen, polyklonal		IF: 1:20	<i>DSHB</i>
mAbdac1-1	Dachshund	Maus, monoklonal		IF: 1:20	<i>DSHB</i>
MR1A	Prospero	Maus, monoklonal		IF: 1:10	<i>DSHB</i>
PDF C7	PDF	Maus, monoklonal		IF: 1:50	<i>DSHB</i>
Phospho-HistoneH3 (Ser10)	pHH3	Kaninchen, polyklonal		IF: 1:200	<i>Millipore</i>

Tabelle 7: Verwendete Antikörper, deren Antigene, Verdünnung und Herkunft

4.8 Enzyme und Kits

Name	Hersteller	Verwendung
<i>Gateway® BP Clonase® II Enzyme mix</i>	<i>ThermoFisher Scientific</i>	BP Klonierung
<i>Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix</i>	<i>ThermoFisher Scientific</i>	LR Klonierung
<i>PeqGOLD TriFast™</i>	<i>Peqlab</i>	RNA-Extraktion
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	<i>Quiagen</i>	DNA-Miniprep
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	<i>Quiagen</i>	Gelextraktion
<i>QuantiTect Reverse Transcription Kit</i>	<i>Quiagen</i>	Reverse Transkription
Restriktionsenzyme	<i>New England Biolabs</i>	Testverdau, präparativer Verdau
<i>SsoFast EvaGreen supermix</i>	<i>BioRad</i>	<i>real time PCR</i>

Tabelle 8: Auflistung kommerziell erhältlicher und verwendeter Kits

4.9 Geräte

Gerät	Hersteller	Verwendungszweck
Axiophot	<i>Zeiss</i>	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie
Centrifuge 5415D	<i>Eppendorf</i>	Tischzentrifuge
Colibri	<i>Zeiss</i>	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie
digital pH/millivolt meter 611	<i>Orion Research</i>	pH-Meter
Digitales Stereomikroskop VHX-500	<i>Keyence</i>	Aufnahme von Fliegenaugen
Leica M2 Fl III	<i>Leica</i>	Fluoreszenzstereomikroskop,
LSM510	<i>Zeiss</i>	Konfokale Laser-ScanningMikroskopie
MiniOpticon™System	<i>BioRad</i>	semiquantitative <i>real-time</i> -PCR
NanoDrop1000	<i>PeqLab</i>	DNA/RNAKonzentrationsbestimmung
Odyssey ® Imaging System	<i>LI-COR Biosciences</i>	Detektion und Quantifizierung Westernblot
Stereomikroskop Stemi 2000	<i>Zeiss</i>	Fliegen absammeln, Präparation
TCS SP8	<i>Leica</i>	Konfokale Laser-ScanningMikroskopie

Tabelle 9: Auflistung verwendeter Geräte

4.10 Software

Programm	Hersteller	Version	Verwendungszweck
Alphamanager	<i>Alpha Innotech</i>	2.0	Geldokumentation
<i>CFX Manager software</i>	<i>Bio-Rad</i>	1.6	Steuerungssoftware des Bio-Rad MiniOpticon Systems
Fiji (ImageJ)		1.50f	Bearbeitung von Konfokalaufnahmen
LSM 510	<i>Zeiss</i>	3.2.0.115	Steuerungssoftware für Zeiss LSM 510
Office	<i>Microsoft</i>	12.0.6612	Erstellen der Masterarbeit

Programm	Hersteller	Version	Verwendungszweck
Papers	<i>Papers</i>	3.2.3	<i>Citationmanager</i>
Prism6	<i>GraphPad</i>	6.0	Statistische Auswertung; Erstellung von Graphen
Snapgene	<i>GSL Biotech LLC</i>	2.3.2	<i>In silico</i> -Klonierung; DNA-alignments

Tabelle 10: Auflistung verwendeter Software

Bei der Bearbeitung der Bilder wurden weder Informationen verschleiert noch hinzugefügt, sondern lediglich die Qualität verbessert. Ob es sich bei den Bildern um Stacks, die aus mehreren Einzelbildaufnahmen zusammengesetzt sind oder um reine Einzelbildaufnahmen handelt, wird in der Abbildungsbeschreibung angegeben.

4.11 Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Enzyme

Chemikalien, Enzyme, und Verbrauchsmaterialien wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Abcam, Bioline, BioRad, Biozym, DSHB, Fermentas, Fluka, Balur, Hartenstein, Kimberley-Clark, LiCor, Menzel, Merck, New England Biolabs, Pall, Pierce, Pharmacia, PeqLab, Polysciences, Qiagen, Roche, Rockland, Roth, Sarstedt, Schleicher & Schuell, SemperMed, Serva, Stratagene, Sigma-Aldrich, ThermoFisher Scientific.

5 Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden - Proteine

5.1.1 Vorversuche zur Überprüfung der Expressionsstärke der getaggtten Proteine in *E. coli*-Zellen

2ml Selektionsmedium wurden mit Rosetta2TM *E. coli*-Zellen, die die jeweiligen Plasmide enthielten, angeimpft und über Nacht bei 37°C mit 220rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde zu 5ml Selektionsmedium so viel aus der Vorkultur zugegeben, bis eine OD von 0,1 erreicht war. Die Kulturen wurden dann erneut bei 37°C mit 220rpm inkubiert. Bei einer OD von 0,6 wurde IPTG unterschiedlicher Konzentration (im Bereich von 0,1mM bis 2,0mM) zur Induktion der Proteinexpression zugegeben. Für die Vorversuche erfolgte die Proteinexpression zwischen einer und 24 Stunden und in einem Temperaturbereich von 18 bis 37°C. Anschließend wurde erneut die OD der einzelnen Kulturen bestimmt, die Zellen abzentrifugiert, das Medium komplett abgenommen und bei -80°C eingefroren.

5.1.2 Expression der GST- oder His-getaggtten Fussel Proteine für die Aufreinigung im kleinen Maßstab

100ml Selektionsmedium wurden mit einer Rosetta2TM *E. coli*-Vorkultur, die die Plasmide zur Expression von GST- oder His-getaggtten Fussel Proteinen enthielten, auf eine OD von 0,1 angeimpft und bei 37°C und 220rpm inkubiert bis eine OD von 0,6 erreicht war. Die Proteinexpression wurde dann mit 0,5mM IPTG induziert und die Kultur wurde drei Stunden lang bei 37°C und 220rpm inkubiert. Die Zellen wurden 10min bei 6000rpm abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde bei -80°C eingefroren.

5.1.3 Aufreinigung von GST-getaggtten Fussel-Proteinen im kleinen Maßstab

Das Zellpellet wurde in 5ml Extraktionspuffer resuspendiert und mittels Sonifizierung (6 x 15sek; 1min Pause; 20% Amplitude) aufgeschlossen. Als Extraktionspuffer dienten PBS (pH 7,4; versetzt mit 0,1mM DTT, 0,1mM EDTA, 0,05mM PMSF, 1xPIC) oder 0,1M Natriumphosphatpuffer (pH 5,8; versetzt mit 0,1mM DTT, 0,1mM EDTA, 0,05mM PMSF, 1xPIC). Die Zellbruchstücke und unlösliche Proteine wurden 30min lang bei 20000g abzentrifugiert. Der Überstand, welcher die lösliche Phase enthielt, wurde

abgenommen. Das abzentrifugierte Pellet wurde in 1ml Puffer B resuspendiert, 10min lang gevortext und 10min bei 20000g zentrifugiert und der Überstand, welcher die unlösliche Phase enthielt, abgenommen. Für die Aufreinigung der in der löslichen Phase enthaltenen GST-getaggtten Fussel-Proteine wurden Glutathion-Cellulosebeads (Roth) und das im Protokoll beschriebene Batch-Verfahren verwendet. Als Wasch- oder Equilibrierungspuffer wurden PBS (pH 7,4) bzw. Natriumphosphatpuffer (pH 5,8) genutzt und für die Elution wurden die Waschpuffer zusätzlich mit 10mM reduzierter Glutathion versetzt. Bei allen Schritten (Extraktion, Waschen, Elution) wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt. Für die Analyse wurden, falls möglich, pro Schritt jeweils 10µg Protein mittels SDS-PAGE und anschließend durch Coomassiefärbung analysiert.

5.1.4 Aufreinigung von His-getaggtten Fussel-Proteinen im kleinen Maßstab

Das Zellpellet wurde in 5ml Extraktionspuffer (PBS pH 7,4; versetzt mit 0,1mM DTT, 0,1mM EDTA, 0,05mM PMSF, 1xPIC) resuspendiert und mittels Sonifizierung (6 x 15sek; 1min Pause; 20% Amplitude) aufgeschlossen. Die Aufreinigung der löslichen und unlöslichen Phase fand, wie unter 5.1.3 beschrieben, statt. Für die Aufreinigung von His-getaggtten Proteine wurden *HisPur Ni-NTA Spin Columns* verwendet. Die lösliche Phase wurde auf die *Ni-NTA Spin Columns* geladen und dann weiter nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Als Wasch- oder Equilibrierungspuffer wurde steriler PBS (pH 7,4) verwendet und für die Elution wurde der Waschpuffer zusätzlich mit 250mM Imidazol versetzt. Bei allen Schritten (Extraktion, Waschen, Elution) wurde die Proteinkonzentration mittels *Bradford* bestimmt. Für die Analyse wurden pro Schritt jeweils 10µg Protein mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung überprüft.

5.1.5 Proteinexpression des Fuss-Fragments für die Antikörperherstellung

100ml Selektionsmedium wurden mit einer Rosetta2TM *E. coli*-Kolonie, die das pQE60-Fussfrag-opt-His-Plasmid enthielt, angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zwei Liter Selektionsmedium wurden am nächsten Morgen mit der Vorkultur auf eine OD von 0,1 angeimpft und bei 37°C und 220rpm inkubiert. Die Proteinexpression wurde bei einer OD von 0,6 mit 0,5mM IPTG induziert. Nach einer Expressionszeit von drei Stunden wurde die Zellsuspension auf 250ml Sorval-Zentrifugenbecher aufgeteilt und die Zellen

zehn Minuten lang bei 6000rpm und 4°C pelletiert, einmal mit sterilem PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert.

5.1.6 Aufreinigung des Fuss-Fragments aus *E. coli*-Zellen

Die Zellpellets wurden in insgesamt 100ml sterilem PBS resuspendiert und auf zwei 50ml Falcon aufgeteilt. Die Zellsuspension wurde 20 Minuten lang sonifiziert und die Zellbruchstücke und unlöslichen Proteine wurden 30min lang bei 20000g abzentrifugiert. Für die Aufreinigung wurde eine *HisTrapCrude* FF 5ml Säule verwendet. Diese Säule wurde mit Hilfe des *Äkta Basic 10 better Systems* (GE Healthcare) mit dem Zelllysats beladen und mit einem Imidazolgradienten eluiert.

Die Reinigung wurde nach folgender Methode durchgeführt:

Chromatographieschritt	Bedingungen
Äquilibration der Säule	5 CV PBS
Waschen der Säule	8 CV PBS
Elution	15 CV Gradient 5mM Imidazol in PBS, pH 7,4, von 10-500mM Imidazol
Es wurden Fraktionen à 2ml gesammelt	
Regenerierung	5 CV H ₂ O (MILLIPORE)
Lagerung	5 CV 20 % Ethanol

Tabelle 11: Schritte der Reinigung über Metallchelataffinitätschromatographie

Die Flussrate betrug 4ml/min. Die Elution der Proteine wurde über die Absorptionsmessung bei 260 und 280nm verfolgt. Die Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte über SDS-PAGE.

5.1.7 Dialyse von Proteinlösungen

Die vereinigten Fraktionen wurden nach der chromatographischen Reinigung gegen ein mindestens 100-faches des Probenvolumens an PBS dialysiert. Dazu wurde die Probe in einem in Pufferlösung equilibrierten Dialyseschlauch (*Serva*) mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 14kDa unter Rühren über Nacht bei 4°C dialysiert. Es erfolgte ein dreimaliges Wechseln des Puffers nach je vier bis sechs Stunden.

5.1.8 Herstellung der polyklonalen Antisera

Am nächsten Tag wurde die Konzentration bestimmt, die Proteinlösung in flüssigen Stickstoff eingetropft und die gefrorenen Tropfen in einen 50ml Falcon bei -80°C gelagert. Dieser wurde für die Antikörperherstellung mit Trockeneis gekühlt zu Davids Biotechnologie gebracht.

Dort wurden zwei Kaninchen nach folgendem Schema immunisiert:

Tag	63-Tage Antiserum
1	Preimmunserum: 1 ml
1	erste Immunisierung
14	zweite Immunisierung
28	dritte Immunisierung <ul style="list-style-type: none"> • Testserum: 1ml
35	<ul style="list-style-type: none"> • ELISA-Titerbestimmung • Optional: Aliquot des Testserums
42	vierte Immunisierung
56	Fünfte Immunisierung
63	Antiserum: 40 - 90 ml

Tabelle 12: Immunisierungsschema

Die Antiseren wurden bei Davids Biotechnologie mittels Affinitätsaufreinigung gegen die injizierte Proteinlösung aufgereinigt. Die polyklonalen Antiseren wurden nach Erhalt in 50µl aliquotiert und bei -20°C gelagert.

5.1.9 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Konzentrationen von Proteinlösungen wurden mit Hilfe des *Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit* und nach der Anleitung des Herstellers bestimmt.

5.1.10 Proteinextraktion aus Larven

Zehn späte L3-Larven wurden in einem Eppendorf-Cup mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und 50µl PCB zugegeben. Danach wurden die Larven mit einem Mikrohandrührer zerkleinert und fünf Minuten auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Gewebebestandteile abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorf-Cup gegeben und bis zur Verwendung auf -20°C eingefroren.

5.1.11 Immunoblot

Proteinlysate wurden zusammen mit 6x Lämmli-Puffer zunächst zwei Minuten lang auf 95°C erhitzt. Dann wurde der Ansatz auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 120V für zwei Stunden die Proteine aufgetrennt. Als Marker wurden 2,5µl des *ColorPlus Prestained Protein Marker* der Firma *New England Biolabs* verwendet. Nach der SDS-PAGE wurde das Trenngel entfernt und das Sammelgel auf eine Nitrozellulosemembran bei 400mA für 60 Minuten geblottet. Alle weiteren Schritte fanden auf einem Schüttler statt. Die Nitrozellulosemembran wurde für 15 Minuten mit

TBS gewaschen, anschließend zwei Stunden in OBP/TBST (1:1) geblockt und über Nacht in der primären Antikörperlösung bei 4°C langsam geschüttelt. Am nächsten Tag wurde der Blot dreifach mit TBST für 15 Minuten gewaschen, ehe die Nitrozellulosemembran in der sekundären Antikörperlösung inkubiert wurde. Abschließend wurde die Nitrozellulosemembran drei Mal mit TBST und einmal mit TBS gewaschen. Die Detektion der Proteine fand mittels des *Odyssey® Infrared Imaging System* der Firma *LI-COR* statt.

5.1.12 Coomassie-Färbung

Der Gellauf erfolgte wie unter 5.1.1.10 beschrieben. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde von den Glasplatten gelöst, in eine Glaspetrischale gegeben und mit ddH₂O einmal kurz gewaschen. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde dann mit Coomassie-Färbelösung überschichtet und in einer Mikrowelle solange erhitzt bis die Lösung zu kochen begann. Anschließend wurde das SDS-Gel 30 Minuten lang auf einem Schüttler inkubiert. Die Coomassie-Färbelösung wurde abgegossen und das SDS-Gel zweimal mit ddH₂O zehn Minuten lang gewaschen. Danach wurde die Entfärbelösung auf das SDS-Gel gegeben und erneut in der Mikrowelle bis zum Kochen erhitzt. Das SDS-Gel wurde solange entfärbt bis klare abgrenzbare Banden detektierbar waren. Abschließend wurde das SDS-Gel mit ddH₂O gewaschen und mit einem *Odyssey® Infrared Imaging System* der Firma *LI-COR* abgelichtet.

5.2 Molekularbiologische Methoden - Nukleinsäuren

5.2.1 Semi-quantitative real-time PCR

Zur Bestimmung der relativen Expression von Genen wurde eine semi-quantitative *real-time* PCR durchgeführt. Dazu wurde ein *MiniOpticon™ System* der Firma *Bio-Rad Laboratories* verwendet. Für jede zu untersuchende cDNA wurde folgender Ansatz pipettiert:

cDNA	1 µl	x7
<i>SsoFast™ EvaGreen® supermix (2x)</i>	5 µl	
ddH ₂ O	3 µl	

Tabelle 13: qPCR Mastermix

Als Negativkontrolle, um etwaige Verunreinigungen des Wassers oder der Primer zu identifizieren, wurde statt cDNA Wasser eingesetzt. Weiter wurden die einzelnen *wells* der Reaktionsplatten mit 9 µl des Mastermix befüllt, um daraufhin zu jeweils drei

Ansätzen pro cDNA das Primerpaar für das *rp49* Gen zu geben, welches als Haushaltsgen dient und zu jeweils drei Ansätzen pro cDNA das Primerpaar für *fuss* zu pipettieren. Pro Primer wurde 0,5µl einer 10µM Primerlösung eingesetzt, so dass der Reaktionsansatz insgesamt 10µl betrug.

Für die Amplifikation wurde ein *two step*-Programm verwendet:

Hitzeaktivierung	98°C	2min	
Denaturierung	98°C	2sec	40x
Annealing/Elongation	55°C	5sec	
Schmelzkurve	75-95°C		Erhöhung um 0,2°C alle 10 Sekunden

Tabelle 14: *two step* qPCR Programm

Zusätzlich wurde eine Schmelzkurve generiert, um die Spezifität der Primer zu überprüfen.

Die Analyse der relativen Genexpressions-Niveaus erfolgte nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Dabei gibt der ΔCT -Wert oder *cycle threshold* an, wann die Fluoreszenz über die Hintergrundfluoreszenz steigt und sich die Kurve somit im exponentiellen Bereich befindet. Der ΔCT -Wert wird dabei nach folgender Formel berechnet:

$$\Delta\text{CT} = \frac{[\text{CT}(\text{Z1}) + \text{CT}(\text{Z2}) + \text{CT}(\text{Z3})] - [\text{CT}(\text{H1}) + \text{CT}(\text{H2}) + \text{CT}(\text{H3})]}{3}$$

Z beschreibt die durchschnittliche Zyklenzahl des Zielgens und H die durchschnittliche Zyklenzahl des Haushaltgens. Der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert wird aus der Differenz der Genexpression des Experiments (E) und der unbehandelten Kontrolle (K) berechnet.

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}(\text{T}) - \Delta\text{CT}(\text{K})$$

Daraus ergibt sich das Expressionsverhältnis *r* des Experiments (T) im Vergleich zur Kontrolle aus folgender Formel:

$$\mathbf{r} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}(\text{T})}$$

5.2.2 Polymerasekettenreaktion

Für TA-Klonierung wurde die *MYFI*TM-Polymerase von *Bioline* und für Gateway-Klonierung die *Q5*[®] *High-Fidelity*-DNA-Polymerase von *NEB* verwendet. Die Amplifikation der jeweiligen DNA-Abschnitte fand nach dem Herstellerprotokoll statt.

Um ein optimales *Annealing* der Primerpaare zu erreichen wurde mit den jeweiligen Polymerasen Temperaturgradient-PCRs von 40°C bis 60°C durchgeführt. Die verwendeten *Annealing*-Temperaturen der Primerpaare sind in Tabellle 5 beschrieben.

5.2.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung fand bei der Firma *GATC* statt und der Service *Lightrun Sequencing* wurde verwendet. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz erstellt:

Primer (10µM)	2,5µl
DNA-Template	500ng
ddH ₂ O	ad 10µl

5.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 0,8%ige Agarosegele, die 0,3µg/ml Ethidiumbromid enthielten, hergestellt und mit einem 24µl Ansatz aus DNA sowie 6x Ladepuffer beladen. Die Gele wurden anschließend mit TAE-Puffer überschichtet- Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 120V. Als DNA-Marker wurden der 1kb *DNA-Ladder* oder der 100bp *DNA-Ladder* von *New England Biolabs* verwendet.

5.2.5 Heat-Shock Transformation von *E. coli*

Hitzeschockkompetente *E. coli*-Zellen wurden zehn Minuten lang auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde der Ligationsansatz (10µl) komplett zu den *E. coli*-Zellen gegeben und erneut zehn Minuten lang auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock wurde bei 42°C für 45 Sekunden durchgeführt und infolgedessen wurden die Zellen auf Eis gegeben. Nach zwei Minuten wurde zu jedem Ansatz 800µl LB₀ gegeben, für eine Stunde bei 37°C inkubiert und danach 15 Sekunden bei 2000U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, so dass noch 100-200µl LB₀ im Cup verblieben. Die Zellen wurden dann im verbliebenen Medium resuspendiert und auf den jeweiligen LB-Selektiv-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.2.6 Analytischer DNA-Verdau

Zur Überprüfung des Inserts nach der Transformation von *E. coli*-Zellen wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Dafür wurden die Restriktionsenzyme von *NEB* verwendet und nach deren Protokoll verfahren. Der einstündige Verdau erfolgte im Wasserbad bei 37°C.

5.2.7 Präparativer DNA-Verdau

Zur Klonierung des gewünschten DNA-Abschnitts in den Endvektor wurde 1 µg des DNA-Abschnitts enthaltenden Subklonierungsvektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen eine Stunde lang bei 37°C im Wasserbad verdaut.

5.2.8 Gelextraktion

Für die Extraktion von DNA aus dem Agarosegel wurde das *QIAquick Gel Extraction Kit* der Firma *Qiagen* verwendet und die Extraktion nach dem beiliegenden Protokoll durchgeführt. Dabei wurde die DNA in 30 µl Wasser eluiert.

5.2.9 Konzentrationsbestimmung

Konzentrationen von DNA- und RNA-Lösungen wurden mit Hilfe des *peqLab NanoDrop1000 Spectrophotometer* bestimmt.

5.2.10 Ligation

Zur Subklonierung wurde das *pGEM®-T Easy Kit* von *Promega* verwendet und das Herstellerprotokoll verwendet. Für die Klonierung in die entsprechenden Zielvektoren wurde nach folgendem Ansatz verfahren:

Expressionsvektor	50ng
2x T4-DNA-Ligasepuffer	5 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl
Insert	x µl
Steriles <i>Biopak</i> -Wasser	ad 10 µl

Tabelle 15: Ligationsansatz

Die Inkubation erfolgte bei 15°C über Nacht im Wasserbad.

Die Insertmenge, die für ein 3:1, 1:1 und 1:3 molares Verhältnis von Insert zu Vektor benötigt wird, wurde mit Hilfe der *BioMath Calculators* von *Promega* berechnet.

5.2.11 RNA-Extraktion aus adulten Fliegen

Total-RNA wurde aus 25 Köpfen von adulten Fliegen mit *peqGOLD Trifast™* nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert und in 30 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

5.2.12 Gewinnung von Plasmid-DNA

Sollte die Plasmid-DNA mittels analytischem Verdau untersucht werden, wurden 2ml Selektionsmedium mit einer *E. Coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Plasmide durch alkalische Lyse

gewonnen und in 50µl Biopak-Wasser aufgenommen (Bimboim und Doly, 1979). Statt der angegebenen 20 Minuten auf -20°C wurde die DNA 120 Minuten gefällt.

Dagegen wurden Plasmide für die Sequenzierung, präparativen Verdau und Mikroinjektion mit Hilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kit* gewonnen, um eine hohe Reinheit gewährleisten zu können. Dazu wurden 4ml Selektionsmedium wie beschrieben angeimpft und anschließend mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* aufgereinigt. Die Säulen wurden mit 30µl Biopak-Wasser eluiert.

5.2.13 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurde das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* der Firma *Qiagen* verwendet. Abweichend vom Protokoll wurde nur 500ng RNA in cDNA umgeschrieben. Die RNA wurde drei Minuten im *gDNA wipeout Buffer* inkubiert und die reverse Transkription-Reaktion wurde auf 30 Minuten verlängert.

5.2.14 BP-Gateway-Reaktion

Die BP-Gateway-Reaktion wurde nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt, wobei aber nur die Hälfte aller angegebenen Mengen verwendet wurde.

5.2.15 LR-Gateway-Reaktion

Die LR-Gateway-Reaktion wurde nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt, wobei aber nur die Hälfte aller angegebenen Mengen verwendet wurde.

5.2.16 Codonoptimierung von *fussel* für die Expression in *E. coli*

Die Codonoptimierung von *fuss* um eine erhöhte Expression in *E. coli* zu erreichen, wurde von GeneArtTM durchgeführt.

5.2.17 Absammeln von adulten Köpfen für RNA-Extraktion

Adulte, männliche Fliegen wurden mit CO₂ betäubt, in 1,5ml Eppendorf-Cups gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden die Eppendorf-Cups kurz gevortext und sofort wieder schockgefroren. Dies wurde 10 Mal wiederholt. Dann wurden die Eppendorf-Cups über zwei zusammengesteckte Siebe entleert, die durch flüssigen Stickstoff gekühlt wurden. Das obere Sieb hatte ein grobmaschigeres Netz, sodass die durch das Vortexen abgetrennten Köpfe in das untere Sieb fielen, während die Körper im oberen Sieb verblieben. Die Siebe wurden voneinander getrennt, die im unteren Sieb gesammelten Köpfe in ein Eppendorf-Cup gegeben und auf -80°C bis zur Extraktion aufbewahrt.

5.3 Histologische Methoden

5.3.1 Absammeln von Embryonen für immunfluoreszente Antikörperfärbung

Fliegen wurden auf mit Hefe bestrichene Eiablageplatten gesetzt. Nach ca. 18h wurden die Eier mit einem Pinsel abgestrichen, in 2ml H₂O gesammelt und in Plastikkörbchen überführt. Zum Entfernen der Hefe wurden die Eier kurz mit H₂O gewaschen und anschließend in 2,5ml Chlorix drei Minuten lang zum Entfernen des Chorions inkubiert. Während nachfolgend die Embryonen fünf Minuten in PBS gewaschen wurden, wurde die Fixierlösung bestehend aus 4ml n-Heptan, 1ml PBS und 100µl Formalin hergestellt. Die Embryonen wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette aus dem Plastikkörbchen in ein Schnappdeckelglas überführt, das PBS mit der Fixierlösung ersetzt und die Embryonen kräftig geschüttelt. Nach 20 Minuten wurde die untere, wässrige Phase entfernt und die Embryonen mit dem n-Heptan in ein Eppendorf-Cup pipettiert. Das verbliebene n-Heptan wurde abgenommen und die Embryonen in einer Lösung bestehend aus 0,5ml n-Heptan und 0,5ml kaltem Methanol (-20°C) eine Minute lang gevortext. Die obere Phase wurde danach durch einen Milliliter Methanol ersetzt und 30 Sekunden lang gevortext. Die Embryonen wurden dreimalig mit Methanol gewaschen und konnten mehrere Wochen bei -20°C in Methanol aufbewahrt werden.

5.3.2 Anfertigung von Ganzpräparaten

Für die Präparation von Larven wurden späte L3 Larven abgesammelt und in eiskaltem PBS präpariert. Dazu wurden diese in der Mitte mit einer Mikroschere zerteilt, umgestülpt und eine Stunde in PFA(4%)/PBST(0,1%) fixiert. Adulte Fliegen wurden mit CO₂ betäubt und zwei Stunden in PFA(4%)/PBST(0,1%) auf einem Rotator fixiert. Das Fixans wurde anschließend abgenommen und die Larven oder adulten Fliegen drei Mal 10 Minuten mit PBST(0,1%) gewaschen. Je nach zu untersuchendem Gewebe wurde dieses freipräpariert, das überschüssige Gewebe entfernt und die Ganzpräparate einmal 10 Minuten mit PBST(0,1%) gewaschen.

5.3.3 Präparation adulter Gehirne

Sofern nicht anders angegeben wurden adulte Männchen mit CO₂ betäubt und in ein Eppendorf-Cup gegeben. Die Männchen wurden dann zwei Stunden lang auf einem Taumler in PFA (4%)/PBST(0,1%) fixiert. Das Fixans wurde entfernt und die Fliegen drei Mal mit PBST(0,1%) jeweils zehn Minuten lang auf dem Taumler gewaschen. Die

Fliegen wurden danach in ein mit PBS-befülltes Blockschälchen gegeben, mit Pinzetten der Rüssel entfernt und der Kopf vom Thorax abgetrennt. Die Pinzetten wurden in die entstandene Öffnung, in der sich vorher der Rüssel befand, eingeführt, die Kopfkapsel geöffnet und das Gehirn freipräpariert. Anschließend wurden die Tracheen entfernt, das Gehirn mit Hilfe einer Pipette in ein frisches Blockschälchen gegeben und erneut mit PBST(0,1%) gewaschen.

5.3.4 Präabsorption der anti-Fuss polyklonalen Antikörper

Es wurden Embryonen, wie unter 5.3.1 beschrieben, abgesammelt, die maximal fünf Stunden alt waren. 100µl Embryonen wurden drei Mal mit PBST(0,1%) je eine Stunde lang gewaschen. Danach wurde die folgende Antikörperlösung zugegeben:

10µl anti-FussT2

25µl NGS

1µl NaAz(10%)

464µl PBST(0,1%)

Die Embryonen wurden mit der Antikörperlösung über Nacht bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung abgenommen und höchstens eine Woche im Kühlschrank aufbewahrt.

5.3.5 Immunfluoreszenzfärbung

Das freipräparierte Gewebe wurden eine Stunde in PBST(0,1%)/NS(5%) geblockt und die Blocklösung wurde dann durch die primäre Antikörperlösung, bestehend aus Normalserum(5%), PBST(0,1%) sowie dem primären Antikörper (Verdünnungen der Antikörper sind Abschnitt 4.7 zu entnehmen) ersetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung abgenommen und das Gewebe drei Mal für mindestens zehn Minuten mit PBST(0,1%) gewaschen. Das Gewebe wurde dann in der sekundären Antikörperlösung, bestehend aus Normalserum(5%), PBST(0,5%) sowie dem sekundären Antikörper, über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Ganzpräparate wurden mindestens drei Mal mit PBST(0,1%) gewaschen und wurden dann auf speziell angefertigten Objektträgern mit einer Vertiefung in *Vectashield® Mounting Media* aufgezogen. Für die Aufnahmen standen ein *Zeiss LSM510* und ein *Leica SP8* zur Verfügung.

5.3.6 BrdU-Proliferationsanalyse

Larven wurden in eiskaltem S2-Schneiderzellmedium in der Mitte zerteilt und der anteriore Teil wurde umgestülpt. Danach wurde das Gewebe einmal mit S2-

Schneiderzellmedium gewaschen und in die BrdU-Inkubationslösung bei RT für 60min gegeben. Zweimal mit PBST(0,5%) gewaschen und 30min in PFA(4%)/PBST(0,5%) fixiert. Erneut zweimal mit PBST(0,5%) gewaschen und die DNA mittels der DNA-Denaturierungslösung aufgeschmolzen. Zweimal wurde das Gewebe mit PBST(0,5%) gewaschen und die Augenscheiben freipräpariert. Anschließend wurde, wie unter 5.1.3 beschrieben, verfahren.

5.3.7 Erzeugung von Fussel-überexprimierenden Klonen

Jungfrauen mit dem Genotyp *y, w, Flp22* auf dem X-Chromosom und Männchen mit *UAS-Fuss-GFP; FRT-actin-Gal4* wurden gekreuzt und 48h lang zur Eiablage auf Nahrungsbrei mit Hefe gehalten. Dann wurde die Parentalgeneration in ein neues Fliegenglas gegeben und die Nachkommen wurden 12 Minuten lang bei 37°C hitzegeschockt. 72h später wurden Augenimaginalscheiben von späten L3-Larven, wie unter 5.3.2 beschrieben, freipräpariert.

5.3.8 Entraining der Fliegen für die anti-Vrille-Färbung

Je zwanzig männliche Fliegen wurden in Gläser ohne Hefe gegeben und für 7 Tage in 12h-Hell/12h-Dunkel-Rhythmus (LD) gehalten ehe sie für die anti-Vrille-Färbung zu ZT14 abgesammelt und 2h lang mit PFA(4%)/PST(0,1%) auf einem Taumler im Dunklen fixiert wurden.

5.4 Keimbahntransformation und genetische Methoden

5.4.1 Mikroinjektion

Die Plasmid-DNA wurde auf 18°C in 30 - 60min alte Embryonen injiziert, da sich zu diesem Zeitpunkt die Embryonen noch im synzytialen Stadium befinden. Zur Injektion wurde der Genotyp *Vasφc31; Mi13731* verwendet, um das im Stamm exprimierte GFP unter der Kontrolle des Fusselpromotors mit einem Gal4 zu ersetzen. Das Chorion der Embryonen wurde auf doppelseitigem Klebeband abgerollt und die Embryonen wurden auf Apfelagar aufgereiht und an den Rand eines mit Klebstoff beschichteten Deckglases übertragen und 10 Minuten auf Silicagel getrocknet. Um eine weitere Austrocknung zu verhindern, wurden die Embryonen mit Voltalef-Öl überschichtet. Das Plasmid 1325 wurde auf 50ng/μl verdünnt und in Injektionspuffer aufgenommen. Die DNA wurde mit einem Druck von ca. 1bar durch eine abgebrochene Glasnadel in die Nähe der Polzellen injiziert. Danach wurden die injizierten Embryonen mit den Deckgläsern auf Apfelagarplatten gegeben und bis zum Schlüpfen der Larven auf 18°C gehalten und dann

die Larven auf einer Nadel aufgenommen und in ein Futterglas transferiert. Bis zum Schlüpfen der Puppen wurden die Larven auf 25°C gehalten.

5.4.2 Selektion der Transformanten und Erzeugung stabiler Linien

Die adulten Männchen wurden zu Jungfrauen des Genotyps *yw; ey^D/ci^D* gekreuzt. Bei erfolgreichem Austausch von GFP durch Gal4 wurde mit dem GFP ebenfalls ein *yellow⁺* Marker entfernt. Dadurch konnten Transformanten durch eine „gelbe“ Pigmentierung selektiert werden und wurden anschließend erneut zu *yw; ey^D/ci^D* gekreuzt. Jungfrauen und Männchen der F2 Generation mit dem Genotyp *yw; fuss-Gal4/ci^D* wurden untereinander gekreuzt um stabile Linien zu erzeugen.

5.4.3 Gewebespezifische Überexpression von Genen und gewebespezifische RNA-Interferenz

Bei der gewebespezifischen Überexpression von Genen beziehungsweise deren cDNAs wurde das binäre Expressionssystem UAS/GAL4 verwendet (Brand und Perrimon, 1993). Für gewebespezifisches RNAi-Gen-*silencing* wurden analog UAS-RNAi-Konstrukte (Lee und Carthew, 2003) genutzt.

5.5 Verhaltensanalysen

5.5.1 *Two choice feeding assay*

Die *wells* einer Sechzig-*wells*-Mikrotiterplatten wurden alternierend mit einer Koffeinelösung (10mM Koffein; 5mM Sucrose; 0,5mg/ml Indigocarmine) oder mit einer Sukroselösung (1mM Sukrose; 0,125mg/ml Sulforhodamine B) befüllt. Dann wurden fünfzig, drei bis fünf Tage alte Männchen pro Genotyp auf Eis betäubt, auf Mikrotiterplatten gegeben und diese verschlossen. Die Männchen verblieben dann drei Stunden lang im Dunklen auf den Mikrotierplatten. Diese wurden dann zusammen mit den Männchen 1h auf -20°C eingefroren und die Farbe ihrer Abdomen analysiert. Nur Platten auf denen über 30% der Fliegen ein farbiges Abdomen aufwiesen wurden ausgezählt. Der Präferenzindex (P.I.) wurde dann nach folgender Formel berechnet: $P.I. = (N_{\text{blau}} + 0.5 N_{\text{lila}}) / (N_{\text{rot}} + N_{\text{blau}} + N_{\text{lila}})$. Jeder Genotyp wurde mindestens sechs Mal getestet.

5.5.2 Negative Geotaxis

Gealterte Männchen wurden 24h vor dem Versuch auf Eis betäubt und jeweils ein Männchen in ein Futterglas ohne Hefe gegeben. Am nächsten Morgen fanden die Versuche zwischen ZT2 und ZT4 immer im gleichen Raum bei 22°C statt. Jede Fliege wurde dann in eine Pipette gegeben und konnten sich 5min akklimatisieren. Dann wurde die Fliege auf den Boden geklopft und analysiert, wie viele Zentimeter die Fliege innerhalb von 12s zurücklegt. Jede Fliege wurde drei Mal getestet und für jeden Genotyp bzw. Alter wurde der Versuch einmal repliziert.

5.5.3 Bestimmung der Lebensdauer

Zur Bestimmung der durchschnittlichen und maximalen Lebensdauer wurden pro Genotyp 100 ein bis drei Tage alte Männchen abgesammelt und davon jeweils 25 Männchen in ein Glas mit Fliegenfutter ohne Hefe gegeben. Die Futtergläser wurden jeden zweiten Tag erneuert. Die Anzahl der toten Fliegen wurde jeden Tag mit Ausnahme der Wochenenden bestimmt und die Lebensspanne mit Hilfe des Prism6-Programms ausgewertet. Die Bestimmung der Lebensdauer wurde zwei Mal repliziert.

5.5.4 Lokomotor-Aktivitäts-Analyse

Die Experimente und Auswertung der Lokomotoraktivität wurden von Matthias Schlichting in Würzburg durchgeführt. Lokomotoraktivität wurde mit dem *Drosophila Activity Monitors* (DAM, Trikinetics, Waltham, MA, USA) analysiert. Drei bis fünf Tage alte Fliegen wurden vereinzelt und in Futterröhrchen gehalten. Diese Futterröhrchen wurden im DAM-System so platziert, das der infrarote Lichtstrahl sich in der Mitte des Futterröhrchens befand. Jeder Monitor wurde an einen Computer angeschlossen, welcher die Anzahl der Lichtstrahlunterbrechungen, die durch die Bewegung der Fliegen verursacht werden, in einminütigen Intervallen aufzeichnet. Die Bewegungen der Fliegen wurden während sieben Tage in einem 12h-Hell/12h-Dunkel-Rhythmus (LD) und den nachfolgenden zehn Tage im Dauerdunkel (DD) aufgezeichnet. Lichtintensität während den Lichtphasen wurde auf 100Lux durch die Verwendung von Weißlicht emittierenden Dioden eingestellt (LEDs, Lumitronix LED-Technik GmbH, Jüningen, Deutschland). 32 Fliegen wurden pro Genotyp aufgezeichnet, aber nur Fliegen, die das ganze Experiment überlebten, wurden ausgewertet. Rohdaten wurden als Aktogramme dargestellt, indem das Plugin ActogramJ (Universität Würzburg; Schmid *et al.*, 2011) für ImageJ verwendet wurde. Im nächsten Schritt wurden die durchschnittlichen Aktivitätsprofile für jedes Experiment berechnet, indem die letzten fünf Tage des LD-Zyklus verwendet wurden.

Dafür wurde zuerst das mittlere Aktivitätslevel für jede Minute des Tages von einzelnen Fliegen innerhalb dieser 5 Tage ermittelt und danach wurde die Aktivität aller Fliegen eines Experiments gemittelt. Alle Aktivitätsprofile wurden durch einen bewegten Mittelwert von elf Werten geglättet, normalisiert auf 1 und mittels QtiPlot dargestellt (version 9.8.8, Ion Vasilief, Craiove, Rumänien; Helfrich-Förster, 2000). Die *morning* (M) und *evening* (E) *activity peaks* wurden für jede einzelne Fliege bestimmt und der Phasenwinkel ($\Delta E-M$) zwischen *morning* und *evening peak* wurde berechnet, um Auswirkungen auf die *peak*-Zeitpunkte zu untersuchen. Die Siesta wurde ebenfalls mittels zweier Näherungen analysiert: 1) Die Summe der Aktivitäten aller Fliegen pro Experiment wurde zwischen ZT4 und ZT8 berechnet und diese Werte wurden gemittelt. 2) Die Dauer der Siesta wurde als die Zeit zwischen dem Abklang des *morning peaks* und des Anstiegs der Aktivität zum *evening peak* bestimmt. Um Auswirkungen auf die Geschwindigkeit der inneren Uhr zu untersuchen, wurde die Freilaufperiode aller Fliegen im Dauerdunkel mittels χ^2 -Analyse analysiert. p-Werte < 0.05 wurden als signifikant angesehen.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

- Akiyoshi, S., Inoue, H., Hanai, J., Kusanagi, K., Nemoto, N., Miyazono, K. und Kawabata, M. (1999). c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor-beta signaling through interaction with smads. *J. Biol. Chem.* **274**, 35269–35277.
- Allan, D. W., Pierre, S. E. S., Miguel-Aliaga, I. und Thor, S. (2003). Specification of Neuropeptide Cell Identity by the Integration of Retrograde BMP Signaling and a Combinatorial Transcription Factor Code. *Cell* **113**, 73–86.
- Amrein, H. und Thorne, N. (2005). Gustatory Perception and Behavior in *Drosophila melanogaster*. *Current Biology* **15**, R673–R684.
- Anzilotti, S., Tornincasa, M., Gerlini, R., Conte, A., Brancaccio, P., Cuomo, O., Bianco, G., Fusco, A., Annunziato, L., Pignataro, G., *et al.* (2015). Genetic ablation of homeodomain-interacting protein kinase 2 selectively induces apoptosis of cerebellar Purkinje cells during adulthood and generates an ataxic-like phenotype. *Cell Death Dis* **6**, e2004.
- Apostolopoulou, A. A., Rist, A. und Thum, A. S. (2015). Taste processing in *Drosophila* larvae. *Front. Integr. Neurosci.* **9**, 10884.
- Arndt, S., Poser, I., Schubert, T., Moser, M. und Bosserhoff, A.-K. (2005). Cloning and functional characterization of a new Ski homolog, Fussel-18, specifically expressed in neuronal tissues. *Lab. Invest.* **85**, 1330–1341.
- Arndt, S., Poser, I., Moser, M. und Bosserhoff, A.-K. (2007). Fussel-15, a novel Ski/Sno homolog protein, antagonizes BMP signaling. *Mol. Cell. Neurosci.* **34**, 603–611.
- Arndt, S. (2008). Die Rolle von Fussel-15, Fussel-18 und TANGO in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen.
- Arndt, S., Schmidt, J., Wacker, E., Karrer, S. und Bosserhoff, A.-K. (2011). Fussel-15, a new player in wound healing, is deregulated in keloid and localized scleroderma. *Am. J. Pathol.* **178**, 2622–2631.
- Band, A. M. und Laiho, M. (2012). SnoN oncoprotein enhances estrogen receptor- α transcriptional activity. *Cellular Signalling* **24**, 922–930.
- Baonza, A. und Freeman, M. (2002). Control of *Drosophila* eye specification by Wingless signalling. *Development* **129**, 5313–5322.
- Barclay, J., Balaguero, N., Mione, M., Ackerman, S. L., Letts, V. A., Brodbeck, J., Canti, C., Meir, A., Page, K. M., Kusumi, K., *et al.* (2001). Ducky Mouse Phenotype of Epilepsy and Ataxia Is Associated with Mutations in the *Cacna2d2* Gene and Decreased Calcium Channel Current in Cerebellar Purkinje Cells. *J. Neurosci.* **21**, 6095–6104.
- Barrio, R., López-Varea, A., Casado, M. und de Celis, J. F. (2007). Characterization of dSnoN and its relationship to Decapentaplegic signaling in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **306**, 66–81.
- Bier, E., Vaessin, H., Shepherd, S., Lee, K., McCall, K., Barbel, S., Ackerman, L., Carretto, R., Uemura, T. und Grell, E. (1989). Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a P-lacZ vector. *Genes Dev.* **3**, 1273–1287.
- Bimboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513–1523.
- Blanco, J., Pauli, T., Seimiya, M., Udolph, G. und Gehring, W. J. (2010). Genetic interactions of eyes absent, twin of eyeless and orthodenticle regulate sine oculis expression during ocellar development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **344**, 1088–1099.

- Blau, J. und Young, M. W.** (1999). Cycling vrilE Expression Is Required for a Functional Drosophila Clock. *Cell* **99**, 661–671.
- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C. Q. und Technau, G. M.** (1996). The Embryonic Central Nervous System Lineages of Drosophila melanogaster. *Dev. Biol.* **179**, 41–64.
- Brand, A. H. und Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401–415.
- Boyer, P. L., Colmenares, C., Stavnezer, E. und Hughes, S. H.** (1993). Sequence and biological activity of chicken snoN cDNA clones. *Oncogene* **8**, 457–466.
- Buenzow, D. E. und Holmgren, R.** (1995). Expression of the Drosophila gooseberry Locus Defines a Subset of Neuroblast Lineages in the Central Nervous System. *Dev. Biol.* **170**, 338–349.
- Burke, R. und Basler, K.** (1996). Dpp receptors are autonomously required for cell proliferation in the entire developing Drosophila wing. *Development* **122**, 2261–2269.
- Cagan, R. L. und Ready, D. F.** (1989). The emergence of order in the Drosophila pupal retina. *Dev. Biol.* **136**, 346–362.
- Chanut, F. und Heberlein, U.** (1997). Role of decapentaplegic in initiation and progression of the morphogenetic furrow in the developing Drosophila retina. *Development* **124**, 559–567.
- Chen, R., Halder, G., Zhang, Z. und Mardon, G.** (1999). Signaling by the TGF-beta homolog decapentaplegic functions reiteratively within the network of genes controlling retinal cell fate determination in Drosophila. *Development* **126**, 935–943.
- Chen, D., Lin, Q., Box, N., Roop, D., Ishii, S., Matsuzaki, K., Fan, T., Hornyak, T. J., Reed, J. A., Stavnezer, E., et al.** (2009). SKI knockdown inhibits human melanoma tumor growth in vivo. *Pigment Cell & Melanoma Research* **22**, 761–772.
- Cheng, Y., Gvakharia, B. und Hardin, P. E.** (1998). Two alternatively spliced transcripts from the Drosophila period gene rescue rhythms having different molecular and behavioral characteristics. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6505–6514.
- Cho, K.-O., Chern, J., Izaddoost, S. und Choi, K.-W.** (2000). Novel Signaling from the Peripodial Membrane Is Essential for Eye Disc Patterning in Drosophila. *Cell* **103**, 331–342.
- Cooley, L., Kelley, R. und Spradling, A.** (1988). Insertional mutagenesis of the Drosophila genome with single P elements. *Science* **239**, 1121–1128.
- Collins, B. H., Rosato, E. und Kyriacou, C. P.** (2004). Seasonal behavior in Drosophila melanogaster requires the photoreceptors, the circadian clock, and phospholipase C. *PNAS* **101**, 1945–1950.
- Colomb, J., Grillenzoni, N., Ramaekers, A. und Stocker, R. F.** (2007). Architecture of the primary taste center of Drosophila melanogaster larvae. *Journal of Comparative Neurology* **502**, 834–847.
- Costa, S., Almeida, A., Castro, A. und Domingues, L.** (2014). Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in Escherichia coli: the novel Fh8 system. *Front. Microbiol.* **5**.
- Curtiss, J. und Mlodzik, M.** (2000). Morphogenetic furrow initiation and progression during eye development in Drosophila: the roles of decapentaplegic, hedgehog and eyes absent. *Development* **127**, 1325–1336.
- Cyran, S. A., Buchsbaum, A. M., Reddy, K. L., Lin, M.-C., Glossop, N. R. J., Hardin, P. E., Young, M. W., Storti, R. V. und Blau, J.** (2003). vrilE, Pdp1, and dClock Form a Second Feedback Loop in the Drosophila Circadian Clock. *Cell* **112**, 329–341.
- Czerny, T., Halder, G., Kloter, U., Souabni, A., Gehring, W. J. und Busslinger, M.** (1999). twin of eyeless, a Second Pax-6 Gene of Drosophila, Acts Upstream of eyeless in the Control of Eye Development. *Molecular Cell* **3**, 297–307.

- Dahanukar, A., Lei, Y.-T., Kwon, J. Y. und Carlson, J. R.** (2007). Two Gr Genes Underlie Sugar Reception in *Drosophila*. *Neuron* **56**, 503–516.
- Das, A., Holmes, T. C. und Sheeba, V.** (2016). dTRPA1 in Non-circadian Neurons Modulates Temperature-Dependent Rhythmic Activity in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Rhythms*.
- Delventhal, R., Carlson, J. R. und Griffith, L. C.** (2016). Bitter taste receptors confer diverse functions to neurons. *eLife* **5**, e11181.
- de Nooij, J. C. und Hariharan, I. K.** (1995). Uncoupling Cell Fate Determination from Patterned Cell Division in the *Drosophila* Eye. *Science* **270**, 983–985.
- Dunipace, L., Meister, S., McNealy, C. und Amrein, H.** (2001). Spatially restricted expression of candidate taste receptors in the *Drosophila* gustatory system. *Current Biology* **11**, 822–835.
- Edenharter, O.** (2011) Expressionsanalyse von dfussel in *Drosophila melanogaster*. *Bachelorarbeit*, Universität Regensburg
- Edmiston, J. S., Yeudall, W. A., Chung, T. D. und Lebman, D. A.** (2005). Inability of Transforming Growth Factor- β to Cause SnoN Degradation Leads to Resistance to Transforming Growth Factor- β -Induced Growth Arrest in Esophageal Cancer Cells. *Cancer Res* **65**, 4782–4788.
- Escudero, L. M. und Freeman, M.** (2007). Mechanism of G1 arrest in the *Drosophila* eye imaginal disc. *BMC Developmental Biology* 2007 7:1 7, 1.
- Feinberg, E. H., VanHoven, M. K., Bendesky, A., Wang, G., Fetter, R. D., Shen, K. und Bargmann, C. I.** (2008). GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP) Defines Cell Contacts and Synapses in Living Nervous Systems. *Neuron* **57**, 353–363.
- Fischer, S., Bayersdorfer, F., Harant, E., Reng, R., Arndt, S., Bosserhoff, A.-K. und Schneuwly, S.** (2012). fussel (fuss)--A negative regulator of BMP signaling in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* **7**, e42349.
- Fisher, B., Weizmann, R., Frise, E., Hammonds, A., Tomancak, P., Beaton, A., Berman, B., Quan, E., Shu, S., Lewis, S., Rubin, G., Barale, C., Laguertas, E., Quinn, J., Ghosh, A., Hartenstein, V., Ashburner, M., Celniker, S.** (2012). BDGP insitu homepage.
- Furukubo-Tokunaga, K., Adachi, Y., Kurusu, M. und Walldorf, U.** (2014). Brain patterning defects caused by mutations of the twin of eyeless gene in *Drosophila melanogaster*. *Fly* **3**, 263–269.
- Geisler, S. J. und Paro, R.** (2015). Trithorax and Polycomb group-dependent regulation: a tale of opposing activities. *Development* **142**, 2876–2887.
- Gendre, N., Lürer, K., Friche, S., Grillenzoni, N., Ramaekers, A., Technau, G. M. und Stocker, R. F.** (2004). Integration of complex larval chemosensory organs into the adult nervous system of *Drosophila*. *Development* **131**, 83–92.
- Gesualdi, S. C. und Haerry, T. E.** (2007). Distinct Signaling of *Drosophila* Activin/TGF- β Family Members. *Fly* **1**, 212–221.
- Glasgow, S. M., Henke, R. M., MacDonald, R. J., Wright, C. V. E. und Johnson, J. E.** (2005). Ptf1a determines GABAergic over glutamatergic neuronal cell fate in the spinal cord dorsal horn. *Development* **132**, 5461–5469.
- Grima, B., Chélot, E., Xia, R. und Rouyer, F.** (2004). Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature* **431**, 869–873.
- Gruber, R.** (2011). Analyse des Expressionsmuster und der Proteininteraktion von dFussel, *Bachelorarbeit*, Universität Regensburg.
- Halder, G., Callaerts, P. und Gehring, W. J.** (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* **267**, 1788–1792.

- Halder, G., Callaerts, P., Flister, S., Walldorf, U., Kloter, U. und Gehring, W. J.** (1998). Eyeless initiates the expression of both sine oculis and eyes absent during *Drosophila* compound eye development. *Development* **125**, 2181–2191.
- Hamada, F. N., Rosenzweig, M., Kang, K., Pulver, S. R., Ghezzi, A., Jegla, T. J. und Garritty, P. A.** (2008). An internal thermal sensor controlling temperature preference in *Drosophila*. *Nature* **454**, 217–220.
- Hanafusa, S., Kawaguchi, T., Umezaki, Y., Tomioka, K. und Yoshii, T.** (2013). Sexual Interactions Influence the Molecular Oscillations in DN1 Pacemaker Neurons in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* **8**, e84495.
- Hardin, P. E.** (2011). Molecular Genetic Analysis of Circadian Timekeeping in *Drosophila*. In *The Genetics of Circadian Rhythms*, pp. 141–173. Elsevier.
- Heberlein, U., Wolff, T. und Rubin, G. M.** (1993). The TGF β homolog dpp and the segment polarity gene hedgehog are required for propagation of a morphogenetic wave in the *Drosophila* retina. *Cell* **75**, 913–926.
- Helfrich Förster, C.** (2000). Differential Control of Morning and Evening Components in the Activity Rhythm of *Drosophila melanogaster*—Sex-Specific Differences Suggest a Different Quality of Activity. *Journal of Biological Rhythms* **15**, 135–154.
- Helfrich Förster, C.** (2004). The circadian clock in the brain: a structural and functional comparison between mammals and insects. *J Comp Physiol A* **190**, 601–613.
- Helfrich-Förster, C., Yoshii, T., Wülbeck, C., Grieshaber, E., Rieger, D., Bachleitner, W., Cusumano, P. und Rouyer, F.** (2007). The Lateral and Dorsal Neurons of *Drosophila melanogaster*: New Insights about Their Morphology and Function. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **72**, 517–525.
- Hermann, C., Yoshii, T., Dusik, V. und Helfrich Förster, C.** (2012). Neuropeptide F immunoreactive clock neurons modify evening locomotor activity and free-running period in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Neurology* **520**, 970–987.
- Horsfield, J., Penton, A., Secombe, J., Hoffman, F. M. und Richardson, H.** (1998). decapentaplegic is required for arrest in G1 phase during *Drosophila* eye development. *Development* **125**, 5069–5078.
- Illic, I.** (2015). The effects of Fussel misexpression in glia cells of *Drosophila melanogaster*. *Masterarbeit*. Universität Regensburg.
- Imoto, I., Pimkhaokham, A., Fukuda, Y., Yang, Z. Q., Shimada, Y., Nomura, N., Hirai, H., Imamura, M. und Inazawa, J.** (2001). SNO is a probable target for gene amplification at 3q26 in squamous-cell carcinomas of the esophagus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 559–565.
- Inoue, H., Imamura, T., Ishidou, Y., Takase, M., Udagawa, Y., Oka, Y., Tsuneizumi, K., Tabata, T., Miyazono, K. und Kawabata, M.** (1998). Interplay of signal mediators of decapentaplegic (Dpp): molecular characterization of mothers against dpp, Medea, and daughters against dpp. *Molecular Biology of the Cell* **9**, 2145–2156.
- Irlbeck, C.** (2014). Identification of *fussel*-regulated genes by RNA-Seq
- Isaac, R. E., Li, C., Leedale, A. E. und Shirras, A. D.** (2009). *Drosophila* male sex peptide inhibits siesta sleep and promotes locomotor activity in the post-mated female. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **277**, rspb20091236–70.
- Iyer, E. P. R., Iyer, S. C., Sullivan, L., Wang, D., Meduri, R., Graybeal, L. L. und Cox, D. N.** (2013). Functional Genomic Analyses of Two Morphologically Distinct Classes of *Drosophila* Sensory Neurons: Post-Mitotic Roles of Transcription Factors in Dendritic Patterning. *PLoS ONE* **8**, e72434.
- Jiao, Y., Moon, S. J., Wang, X., Ren, Q. und Montell, C.** (2008). Gr64f Is Required in Combination with Other Gustatory Receptors for Sugar Detection in *Drosophila*. *Current Biology* **18**, 1797–1801.

- Kadener, S., Stoleru, D., McDonald, M., Nawathean, P. und Rosbash, M.** (2007). Clockwork Orange is a transcriptional repressor and a new *Drosophila* circadian pacemaker component. *Genes Dev.* **21**, 1675–1686.
- Kapust, R. B. und Waugh, D. S.** (1999). Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* **8**, 1668–1674.
- Kawabata, M. und Miyazono, K.** (1999). Signal transduction of the TGF-beta superfamily by Smad proteins. *J. Biochem.* **125**, 9–16.
- Kim, E. Y. und Edery, I.** (2006). Balance between DBT/CKIε kinase and protein phosphatase activities regulate phosphorylation and stability of *Drosophila* CLOCK protein. *PNAS* **103**, 6178–6183.
- Kim, H., Choi, M. S., Kang, K. und Kwon, J. Y.** (2016). Behavioral Analysis of Bitter Taste Perception in *Drosophila* Larvae. *Chem. Senses* **41**, 85–94.
- Kiyono, K., Suzuki, H. I., Morishita, Y., Komuro, A., Iwata, C., Yashiro, M., Hirakawa, K., Kano, M. R. und Miyazono, K.** (2009). c-Ski overexpression promotes tumor growth and angiogenesis through inhibition of transforming growth factor-β signaling in diffuse-type gastric carcinoma. *Cancer Science* **100**, 1809–1816.
- Kullmann, L.** (2014). Analysis of the Fuss-dependent chromatin associated transcriptional regulation in *Drosophila melanogaster*. *Masterarbeit*. Universität Regensburg.
- Kumar, J. P. und Ready, D. F.** (1995). Rhodopsin plays an essential structural role in *Drosophila* photoreceptor development. *Development* **121**, 4359–4370.
- Kumar, J. P.** (2001). Signalling pathways in *Drosophila* and vertebrate retinal development. - PubMed - NCBI. *Nature Reviews Genetics* **2**, 846–857.
- Kunio Isono, H. M.** (2010). Molecular and Cellular Designs of Insect Taste Receptor System. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **4**, 20.
- Le Scolan, E., Zhu, Q., Wang, L., Bundyopadhyay, A., Javelaud, D., Mauviel, A., Sun, L. und Luo, K.** (2008). Transforming growth factor-beta suppresses the ability of Ski to inhibit tumor metastasis by inducing its degradation. *Cancer Res* **68**, 3277–3285.
- Lee, C., Bae, K. und Edery, I.** (1999). PER and TIM Inhibit the DNA Binding Activity of a *Drosophila* CLOCK-CYC/dBMAL1 Heterodimer without Disrupting Formation of the Heterodimer: a Basis for Circadian Transcription. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5316–505.
- Lee, J. D. und Treisman, J. E.** (2001). The role of Wingless signaling in establishing the anteroposterior and dorsoventral axes of the eye disc. *Development* **128**, 1519–1529.
- Lee, Y., Moon, S. J. und Montell, C.** (2009). Multiple gustatory receptors required for the caffeine response in *Drosophila*. *PNAS* **106**, 4495–4500.
- Lee, Y., Kim, S. H. und Montell, C.** (2010). Avoiding DEET through Insect Gustatory Receptors. *Neuron* **67**, 555–561.
- Li, Y., Turck, C. M., Teumer, J. K. und Stavnezer, E.** (1986). Unique sequence, ski, in Sloan-Kettering avian retroviruses with properties of a new cell-derived oncogene. *Journal of Virology* **57**, 1065–1072.
- Lim, C. und Allada, R.** (2013). Emerging roles for post-transcriptional regulation in circadian clocks. *Nature Neuroscience* **16**, 1544–1550.
- Lin, Y., Stormo, G. D. und Taghert, P. H.** (2004a). The Neuropeptide Pigment-Dispersing Factor Coordinates Pacemaker Interactions in the *Drosophila* Circadian System. *J. Neurosci.* **24**, 7951–7957.
- Lin, H. V., Rogulja, A. und Cadigan, K. M.** (2004b). Wingless eliminates ommatidia from the edge of the developing eye through activation of apoptosis. *Development* **131**, 2409–2418.

- Lin, S. J., Lerch, T. F., Cook, R. W., Jardetzky, T. S. und Woodruff, T. K.** (2006). The structural basis of TGF- β , bone morphogenetic protein, and activin ligand binding. *Reproduction* **132**, 179–190.
- Liang, Y.-Y., Lin, X., Liang, M., Brunicardi, F. C., Dijke, ten, P., Chen, Z., Choi, K.-W. und Feng, X.-H.** (2003). dSmurf selectively degrades decapentaplegic-activated MAD, and its overexpression disrupts imaginal disc development. *J. Biol. Chem.* **278**, 26307–26310.
- Macpherson, L. J., Zaharieva, E. E., Kearney, P. J., Alpert, M. H., Lin, T.-Y., Turan, Z., Lee, C.-H. und Gallio, M.** (2015). Dynamic labelling of neural connections in multiple colours by trans-synaptic fluorescence complementation. *Nat Comms* **6**, 10024.
- Majercak, J., Sidote, D., Hardin, P. E. und Edery, I.** (1999). How a Circadian Clock Adapts to Seasonal Decreases in Temperature and Day Length. *Neuron* **24**, 219–230.
- Majercak, J., Chen, W.-F. und Edery, I.** (2004). Splicing of the period Gene 3'-Terminal Intron Is Regulated by Light, Circadian Clock Factors, and Phospholipase C. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 3359–3372.
- Mardon, G., Solomon, N. M. und Rubin, G. M.** (1994). dachshund encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development* **120**, 3473–3486.
- Marqués, G., Bao, H., Haerry, T. E., Shimell, M. J., Duchek, P., Zhang, B. und O'connor, M. B.** (2002). The *Drosophila* BMP Type II Receptor Wishful Thinking Regulates Neuromuscular Synapse Morphology and Function. *Neuron* **33**, 529–543.
- Martín-Castellanos, C. und Edgar, B. A.** (2002). A characterization of the effects of Dpp signaling on cell growth and proliferation in the *Drosophila* wing. *Development* **129**, 1003–1013.
- Massagué, J.** (1998). TGF- β SIGNAL TRANSDUCTION. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 753–791.
- Meier K.** (2015). Etablierung eines ChIP-Seq Protokolls in Schneider Zellen (S2R+), *Masterarbeit*, Universität Regensburg.
- Metaxakis, A., Oehler, S., Klinakis, A. und Savakis, C.** (2005). Minos as a Genetic and Genomic Tool in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **171**, 571–581.
- Minaki, Y., Nakatani, T., Mizuhara, E., Inoue, T. und Ono, Y.** (2008). Identification of a novel transcriptional corepressor, Corl2, as a cerebellar Purkinje cell-selective marker. *Gene Expr. Patterns* **8**, 418–423.
- Miyamoto, T., Slone, J., Song, X. und Amrein, H.** (2012). A Fructose Receptor Functions as a Nutrient Sensor in the *Drosophila* Brain. *Cell* **151**, 1113–1125.
- Mizuhara, E., Nakatani, T., Minaki, Y., Sakamoto, Y. und Ono, Y.** (2005). Corl1, a novel neuronal lineage-specific transcriptional corepressor for the homeodomain transcription factor Lbx1. *J. Biol. Chem.* **280**, 3645–3655.
- Montell, C.** (2009). A Taste of the *Drosophila* Gustatory Receptors. *Current opinion in neurobiology* **19**, 345–353.
- Moon, S. J., Köttgen, M., Jiao, Y., Xu, H. und Montell, C.** (2006). A taste receptor required for the caffeine response in vivo. *Curr. Biol.* **16**, 1812–1817.
- Nomura, T., Khan, M. M., Kaul, S. C., Dong, H. D., Wadhwa, R., Colmenares, C., Kohno, I. und Ishii, S.** (1999). Ski is a component of the histone deacetylase complex required for transcriptional repression by Mad and thyroid hormone receptor. *Genes Dev.* **13**, 412–423.
- Nakatani, T., Minaki, Y., Kumai, M., Nitta, C. und Ono, Y.** (2014). The c-Ski family member and transcriptional regulator Corl2/Skor2 promotes early differentiation of cerebellar Purkinje cells. *Dev. Biol.* **388**, 68–80.
- Nyman, T., Trésaugues, L., Welin, M., Lehtiö, L., Flodin, S., Persson, C., Johansson, I., Hammarström, M. und Nordlund, P.** (2010). The Crystal Structure of the Dachshund Domain of Human SnoN Reveals Flexibility in the Putative Protein Interaction Surface. *PLoS ONE* **5**, e12907.

- Panda, S., Hogenesch, J. B. und Kay, S. A.** (2002). Circadian rhythms from flies to human. *Nature* **417**, 329–335.
- Parker, L., Stathakis, D. G. und Arora, K.** (2004). Regulation of BMP and activin signaling in *Drosophila*. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **34**, 73–101.
- Pfeiffer, B. D., Ngo, T.-T. B., Hibbard, K. L., Murphy, C., Jenett, A., Truman, J. W. und Rubin, G. M.** (2010). Refinement of Tools for Targeted Gene Expression in *Drosophila*. *Genetics* **186**, 735–755.
- Podos, S. D., Hanson, K. K., Wang, Y.-C. und Ferguson, E. L.** (2001). The DSmurf Ubiquitin-Protein Ligase Restricts BMP Signaling Spatially and Temporally during *Drosophila* Embryogenesis. *Developmental Cell* **1**, 567–578.
- Polz, J.** (2014) Etablierung einer dfussel-GAL4 Treiberlinie und immuncytochemische Expressionsanalyse des T1-anti-Fussel Antikörpers. *Bachelorarbeit*, Universität Regensburg.
- Rashidian, J., Le Scolan, E., Ji, X., Zhu, Q., Mulvihill, M. M., Nomura, D. und Luo, K.** (2015). Ski regulates Hippo and TAZ signaling to suppress breast cancer progression. *Science Signaling* **8**, ra14–ra14.
- Raß, M.** (2012) Die Funktion von Fussel in der Augenentwicklung: Dpp abhängige und unabhängige Signalwege. *Masterarbeit*, Universität Regensburg.
- Ready, D. F., Hanson, T. E. und Benzer, S.** (1976). Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. *Dev. Biol.* **53**, 217–240.
- Reed, J. A., Lin, Q., Chen, D., Mian, I. S. und Medrano, E. E.** (2005). SKI pathways inducing progression of human melanoma. *Cancer Metastasis Rev* **24**, 265–272.
- Rieger, D., Shafer, O. T., Tomioka, K. und Helfrich Förster, C.** (2006). Functional Analysis of Circadian Pacemaker Neurons in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* **26**, 2531–2543.
- Roessingh, S., Wolfgang, W. und Stanewsky, R.** (2015). Loss of *Drosophila melanogaster* TRPA1 Function Affects “Siesta” Behavior but Not Synchronization to Temperature Cycles. - PubMed - NCBI. *Journal of Biological Rhythms* **30**, 492–505.
- Russow, D.** (2016). Expressionsanalyse der alternativen Spleißform FussD und funktionelle Analyse der lncRNA Cr44030 im Kontext zur Fussel-Expression in *Drosophila melanogaster*. *Bachelorarbeit*, Universität Regensburg.
- Rogulja-Ortmann, A., Lüer, K., Seibert, J., Rickert, C. und Technau, G. M.** (2007). Programmed cell death in the embryonic central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* **134**, 105–116.
- Sathyanarayanan, S., Zheng, X., Xiao, R. und Sehgal, A.** (2004). Posttranslational Regulation of *Drosophila* PERIOD Protein by Protein Phosphatase 2A. *Cell* **116**, 603–615.
- Schlichting, M., Menegazzi, P. und Helfrich Förster, C.** (2015). Normal vision can compensate for the loss of the circadian clock. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **282**, 20151846.
- Schmid, B., Helfrich Förster, C. und Yoshii, T.** (2011). A New ImageJ Plug-in “ActogramJ” for Chronobiological Analyses. *Journal of Biological Rhythms* **26**, 464–467.
- Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J. und Technau, G. M.** (1997). The Embryonic Central Nervous System Lineages of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **189**, 186–204.
- Schmittlein, C.** (2012) Klonierung und Analyse von drei Überexpressionskonstrukten: dfusselBkC, dfusselBkC-GFP und dfusselBk-GFP in *Drosophila melanogaster*. *Diplomarbeit*, Universität Regensburg
- Schramm, M.** (2016) Funktionelle Analyse der Smad4-Bindedomäne des Fussel-Proteins in *Drosophila melanogaster* und Erzeugung neuer gene und protein traps am fussel-Locus mit Hilfe von Mi{MIC}-Linien, *Bachelorarbeit*, Universität Regensburg.
- Shen, W. und Mardon, G.** (1997). Ectopic eye development in *Drosophila* induced by directed dachshund expression. *Development* **124**, 45–52.

- Shih, H.-W. und Chiang, A.-S.** (2011). Anatomical Characterization of Thermosensory AC Neurons in the Adult *Drosophila* Brain. *Journal of Neurogenetics* **25**, 1–6.
- Shinagawa, T., Dong, H.-D., Xu, M., Maekawa, T. und Ishii, S.** (2000). The sno gene, which encodes a component of the histone deacetylase complex, acts as a tumor suppressor in mice. *EMBO J* **19**, 2280–2291.
- Shrivage, B. V., Altmann, G., Technau, M. und Roth, S.** (2007). The role of Dpp and its inhibitors during eggshell patterning in *Drosophila*. *Development* **134**, 2261–2271.
- Sik Lee, Y.** (2003). Making a better RNAi vector for *Drosophila*: use of intron spacers. *Methods* **30**, 322–329.
- Silver, S. J. und Rebay, I.** (2005). Signaling circuitries in development: insights from the retinal determination gene network. *Development* **132**, 3–13.
- Stavenga, D. G. und Arikawa, K.** (2008). One Rhodopsin per Photoreceptor: Iro-C Genes Break the Rule. *PLOS Biol* **6**, e115.
- Stocker, R. F.** (1994). The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell Tissue Res* **275**, 3–26.
- Stoleru, D., Peng, Y., Agosto, J. und Rosbash, M.** (2004). Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*. *Nature* **431**, 862–868.
- Takaesu, N. T., Hyman-Walsh, C., Ye, Y., Wisotzkey, R. G., Stinchfield, M. J., O'Connor, M. B., Wotton, D. und Newfeld, S. J.** (2006). dSno Facilitates Baboon Signaling in the *Drosophila* Brain by Switching the Affinity of Medea Away From Mad and Toward dSmad2. *Genetics* **174**, 1299–1313.
- Takaesu, N. T., Stinchfield, M. J., Shimizu, K., Arase, M., Quijano, J. C., Watabe, T., Miyazono, K. und Newfeld, S. J.** (2012). *Drosophila* CORL is required for Smad2-mediated activation of Ecdysone Receptor expression in the mushroom body. *Development* **139**, 3392–3401.
- Takahata, M., Inoue, Y., Tsuda, H., Imoto, I., Koinuma, D., Hayashi, M., Ichikura, T., Yamori, T., Nagasaki, K., Yoshida, M., et al.** (2009). SKI and MEL1 Cooperate to Inhibit Transforming Growth Factor- β Signal in Gastric Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 3334–3344.
- Tataroglu, O. und Emery, P.** (2014). Studying circadian rhythms in *Drosophila melanogaster*. *Methods* **68**, 140–150.
- Thibault, S. T., Singer, M. A., Miyazaki, W. Y., Milash, B., Dompe, N. A., Singh, C. M., Buchholz, R., Demsky, M., Fawcett, R., Francis-Lang, H. L., et al.** (2004). A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nature Genetics* **36**, 283–287.
- Tomlinson, A. und Ready, D. F.** (1987). Neuronal differentiation in the *Drosophila* ommatidium. *Dev. Biol.* **120**, 366–376.
- Tomlinson, A.** (2012). The Origin of the *Drosophila* Subretinal Pigment Layer. *The Journal of comparative neurology* **520**, 2676–2682.
- Treisman, J. E. und Rubin, G. M.** (1995). wingless inhibits morphogenetic furrow movement in the *Drosophila* eye disc. *Development* **121**, 3519–3527.
- Tsuneizumi, K., Nakayama, T., Kamoshida, Y., Kornberg, T. B., Christian, J. L. und Tabata, T.** (1997). Daughters against dpp modulates dpp organizing activity in *Drosophila* wing development. *Nature* **389**, 627–631.
- Venken, K. J. T., Schulze, K. L., Haelterman, N. A., Pan, H., He, Y., Evans-Holm, M., Carlson, J. W., Levis, R. W., Spradling, A. C., Hoskins, R. A., et al.** (2011). MiMIC: a highly versatile transposon insertion resource for engineering *Drosophila melanogaster* genes. *Nature methods* **8**, 737.

- Wang, B., Harrison, W., Overbeek, P. A. und Zheng, H.** (2011). Transposon mutagenesis with coat color genotyping identifies an essential role for Skor2 in sonic hedgehog signaling and cerebellum development. *Development* **138**, 4487–4497.
- Wang, Z., Singhvi, A., Kong, P. und Scott, K.** (2004). Taste Representations in the Drosophila Brain. *Cell* **117**, 981–991.
- Weiss, L. A., Dahanukar, A., Kwon, J. Y., Banerjee, D. und Carlson, J. R.** (2011). The Molecular and Cellular Basis of Bitter Taste in Drosophila. *Neuron* **69**, 258–272.
- Wijnen, H. und Young, M. W.** (2008). The Right period for a Siesta. *Neuron* **60**, 943–946.
- Wilson, J. J., Malakhova, M., Zhang, R., Joachimiak, A. und Hegde, R. S.** (2004). Crystal Structure of the Dachshund Homology Domain of Human SKI. *Structure* **12**, 785–792.
- Wolff, T. und Ready, D. F.** (1991). The beginning of pattern formation in the Drosophila compound eye: the morphogenetic furrow and the second mitotic wave. *Development* **113**, 841–850.
- Wright, K. P., Jr., McHill, A. W., Birks, B. R., Griffin, B. R., Rusterholz, T. und Chinoy, E. D.** (2013). Entrainment of the Human Circadian Clock to the Natural Light-Dark Cycle. *Current Biology* **23**, 1554–1558.
- Wu, J.-W., Krawitz, A. R., Chai, J., Li, W., Zhang, F., Luo, K. und Shi, Y.** (2002). Structural Mechanism of Smad4 Recognition by the Nuclear Oncoprotein Ski. *Cell* **111**, 357–367.
- Yang, Q., Li, L., Chen, Q., Foldvary-Schaefer, N., Ondo, W. G. und Wang, Q. K.** (2011). Association studies of variants in MEIS1, BTBD9, and MAP2K5/SKOR1 with restless legs syndrome in a US population. *Sleep Medicine* **12**, 800–804.
- Yoshii, T., Hermann-Luibl, C. und Helfrich Förster, C.** (2015). Circadian light-input pathways in Drosophila. *Communicative & Integrative Biology* **9**, e1102805.
- Zeglinski, M. R., Hnatowich, M., Jassal, D. S. und Dixon, I. M. C.** (2015). SnoN as a novel negative regulator of TGF- β /Smad signaling: a target for tailoring organ fibrosis. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **308**, H75–H82.
- Zahn, M.** (2013). Studien zur Funktion der regulatorischen Region zwischen den Genen *fuss* und *toy*.
- Zhang, Y., Liu, Y., Bilodeau-Wentworth, D., Hardin, P. E. und Emery, P.** (2010). Light and Temperature Control the Contribution of Specific DN1 Neurons to Drosophila Circadian Behavior. *Current Biology* **20**, 600–605.
- Zhao, X., Li, G. und Liang, S.** (2013). Several Affinity Tags Commonly Used in Chromatographic Purification. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* **2013**, 1–8.

6.2 Analyse der Siesta nach Knockdown von Fuss in unterschiedlichen Neuronen

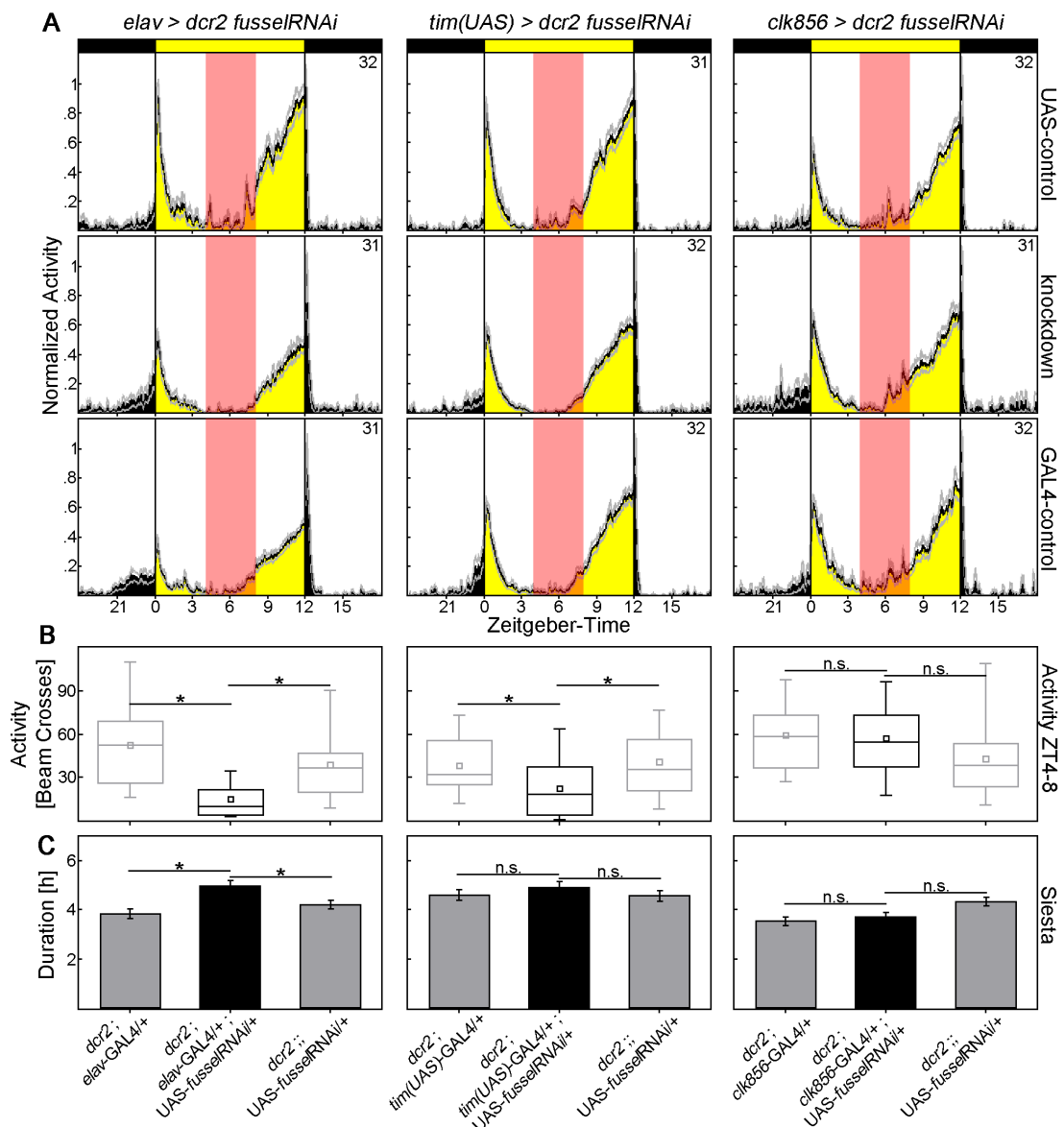


Abbildung 63: Knockdown von Fuss in allen Neuronen führt ebenfalls zu einem Siestaphänotyp. Knockdown von Fuss wurde in allen Neuronen (*elav*-Gal4; linke Spalte), in allen Uhrneuronen (*tim(UAS)*-GAL4; mittlere Spalte) und in einem Teil der dorsalen Uhrneuronen (*clk856*-GAL4; rechte Spalte) vorgenommen. Als Kontrolle wurde die Gal4-Linie und die Knockdown Linie zu *dcr2* gekreuzt. Nur der Knockdown in allen Neuronen (linke Spalte) zeigt sowohl eine erniedrigte Aktivität während der Siesta (B) und eine verlängerte Siesta (C). Der Knockdown in allen Uhrneuronen (mittlere Spalte) führt zu einer verringerten Aktivität während der Siesta (B), jedoch nicht zu einer Verlängerung derselben (C). Dies ist auf den genetischen Hintergrund zurückzuführen (persönliche Kommunikation mit Matthias Schlichting). Ein Knockdown in den dorsalen Uhrneuronen (rechte Spalte) verändert weder die Aktivität der Fliegen in der Siesta noch die Dauer der Siesta.

6.3 Vergleich von Fuss und Gsb im VNS

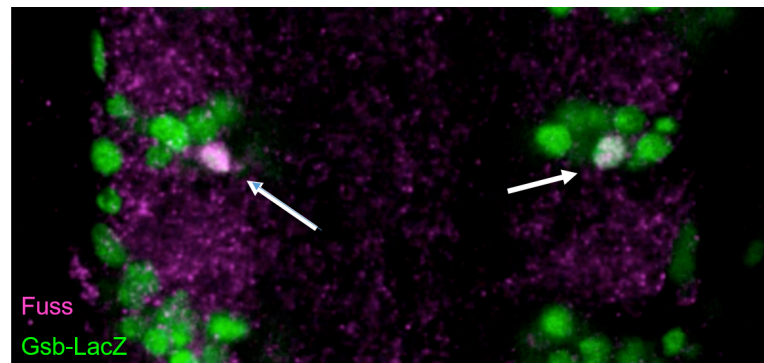


Abbildung 64: Ein Fuss-Neuron je Thorakalheminuomer zeigt Gooseberry-Expression. In den hier gezeigten T2-Segmenten kolokalisiert Gossberry und Fuss in einem Neuron (Pfeil).

6.4 Vergleich von Fuss und Engrailed im VNS

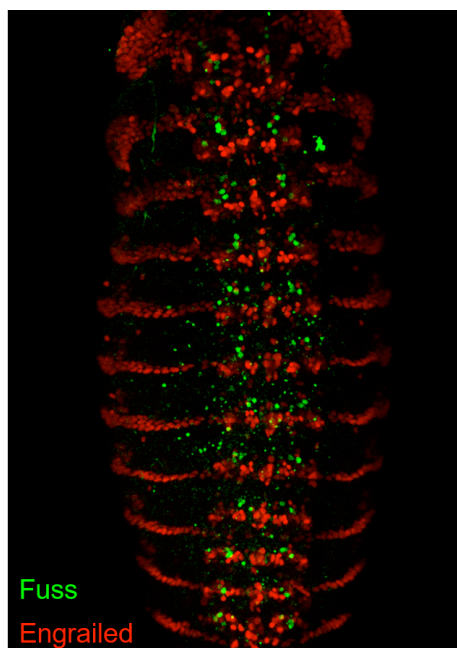


Abbildung 65: Engrailed und Fuss kolokalisieren nicht im VNS. Zwischen Fuss (grün) und Engrailed (rot) konnte keine Kolokalisation im embryonalen Strickleiternnervensystem festgestellt werden. Fuss-Zellen liegen aber nah an den Engrailed-positiven Zellen.

6.5 Bindestellen von Fuss am *spa*-Genlokus



Abbildung 66: Fuss bindet an den *spa*-Genlokus. Fuss bindet, wenn es überexprimiert im Embryo (embryopeaks.bed) oder in S2-Zellen (GFP4_peaks.bed, GFP8_peaks.bed) wird, an den *spa* (sv)-Genlokus. Genauer gesagt an 3'UTR von *spa*. Pfeile geben Orientierung der Reads und Gene wieder. Striche spiegeln Introns wieder, dicke Balken die translatierte Sequenz und mittlere Balken 5'UTR und 3'UTR.

6.6 Sequenz von Fussfrag-opt-His

MESTRTDCNNPAQSTRTTTVLTHNSISASSHQIVGHKTFSPILGKIHSNPEKNRIV
SVFASSTGNADDNDDDEVVDIETTEDEGKFTVQHADSPKTQYDAISGSDSPS
RSPSTSTNIDVEQDVDVDIITDTEDQLELRSHHHHHH

6.7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip der Signalweiterleitung des BMP- bzw. TGF- β -Signalwegs..	3
Abbildung 2: Proteine der Ski/Sno-Familie in <i>Drosophila melanogaster</i> und im humanen System.	4
Abbildung 3: Negative Regulation des TGF- β -Signalwegs durch Ski/Sno-Proteine.	5
Abbildung 4: Funktionen von Fuss im BMP-Signalweg und Fussel18 im TGF- β -Signalweg.	7
Abbildung 5: Die unterschiedlichen Spleißformen von fuss.	8
Abbildung 6: Pilzkörper von Df(4)dCORL-Individuen weisen larvale und adulte Defekte auf.	9
Abbildung 7: Die Uhrneurone im adulten Gehirn von <i>Drosophila melanogaster</i> ..	10
Abbildung 8: Die circadiane Lokomotoraktivität unter Labor- bedingungen.	11
Abbildung 9: Circadiane Lokomotoraktivität an kalten und heißen Tagen.	12
Abbildung 10: Verteilung der gustatorischen Neurone auf der ganzen Fliege und im larvalen und adulten Pharynx.	13
Abbildung 11: Lage der gustatorischen Sensillen auf dem Labialpalpus und Aufbau einer einzelnen Sensille.	14
Abbildung 12: Schematische Darstellung eines Ommatidiums im Quer- und Längsschnitt.	16
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Progression der morphogenetischen Furche.	17
Abbildung 14: Schematische Darstellung des Retinal Determination Gene Networks.	18
Abbildung 15: Das MiMIC-Transposon.	20
Abbildung 16: Expressionsanalyse der FussB-Spleißform.	22
Abbildung 17: Expressionsanalyse der codonoptimierten GST-getaggten FussB-Spleißform.	23

Abbildung 18: Aufreinigung der C-terminalen GST-getaggten FussB-Spleißform.	24
Abbildung 19: Schematische Darstellung des zu exprimierenden Abschnitts Fussfrag-opt von Fuss.	25
Abbildung 20: Expressionsanalyse eines C-terminal 6xHis-getaggten Abschnitts des codonoptimierten Fuss.	25
Abbildung 21: Aufreinigung von Fussfrag-opt-His nach dreistündiger Expression bei 37°C.	26
Abbildung 22: Aufreinigung von Fussfrag-opt-His nach 18h Expression bei 20°C bzw. 37°C.	26
Abbildung 23: Analyse des aufgereinigten Eluats mittels Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgels und anti-His Immunoblot.	27
Abbildung 24: Detektion der im Eluat enthaltenen Proteine mit anti-FussT1 und anti-FussT2 mittels Immunoblotting.	28
Abbildung 25: Detektion von Fuss-GFP mit anti-FussT1 und anti-FussT2.	29
Abbildung 26: Vergleich des Fuss-Expressionsmusters der RNA-in-situ-Hybridisierung mit der Immunfluoreszenzfärbung mit anti-FussT2.	30
Abbildung 27: Lokalisation der MiMIC-Insertionen Mi03207 und Mi13731 im fuss-Genloкус.	31
Abbildung 28: Das zentrale Nervensystem homozygoter Larven der Mi13731-Linie weist weniger GFP-positive Zellen auf als das heterozygoter Larven.	32
Abbildung 29: Vergleich der relativen Transkriptmengen von Fussel aus Kopfextrakten zwischen CantonS, heterozygoten Mi13731/+ und homozygoten Mi13731-Fliegen.	33
Abbildung 30: Analyse der Kolokalisation von Fuss und GFP in larvalen Gehirnen von heterozygoten oder homozygoten Mi13731-Larven.	34
Abbildung 31: Charakterisierung der fuss-Gal4-Linie.	35
Abbildung 32: Fuss ist in Neuronen exprimiert.	36
Abbildung 33: Fuss ist embryonal nicht in GMZ, sondern nur in postmitotischen Neuronen exprimiert.	37
Abbildung 34: Fuss ist larval in postmitotischen Neuronen exprimiert.	37
Abbildung 35: Pro Hemineuromer exprimiert ein Fuss-Neuron Toy.	38
Abbildung 36: Toy und Dac werden in einem Fuss-Neuron nie koexprimiert.	39
Abbildung 37: Fuss kolokalisiert partiell mit Apterous.	40

Abbildung 38: Fuss-Neurone schütten Acetylcholin, GABA und Glutamat aus.	41
Abbildung 39: Fuss-Expression im larvalen, stomatogastrischen Nervensystem und im larvalen Geschmackssystem.	42
Abbildung 40: Verlust der Fuss-Expression führt nicht zu Zelltod.	44
Abbildung 41: Fussel ist nicht in Kenyonzellen exprimiert.	45
Abbildung 42: Keine verringerte Lebensdauer bei homozygoten Mi13731-Fliegen.	46
Abbildung 43: EcR1B wird nicht durch Fuss oder Fuss-Neurone beeinflusst.	47
Abbildung 44: Fuss-Expression oder Fuss-Neurone sind nicht für eine korrekte Pilzkörperentwicklung notwendig.	48
Abbildung 45: Fussel ist nicht in Zellen exprimiert, in denen der Dpp-Signalweg aktiv ist.	49
Abbildung 46: In Fuss-mutanten Neuronen kann kein pMad detektiert werden. .	50
Abbildung 47: Fuss ist kein negativer Regulator von Spa.	51
Abbildung 48: Fuss ist kein positiver Regulator von Spa.	51
Abbildung 49: Fuss ist adult exprimiert und Fuss-Neurone projizieren in den optischen Lobus.	52
Abbildung 50: Fuss ist nicht in den PDF-Neuronen exprimiert und beeinflusst diese nicht.	53
Abbildung 51: Fuss-Neurone sind keine Uhrneurone.	54
Abbildung 52: Analyse der Aktivität während des Tagesverlaufs von homozygoten Mi13731-Fliegen.	56
Abbildung 53: Verringerung der Klettergeschwindigkeit von homozygoten Mi13731-Männchen mit zunehmendem Alter.	57
Abbildung 54: Kein Verlust von mutanten Fuss-Neuronen mit zunehmendem Alter.	58
Abbildung 55: Analyse der Expression und Funktion von Fuss in den gustatorischen Neuronen.	59
Abbildung 56: Adulte zeigen Auswüchse aus den Augen.	61
Abbildung 57: Fuss-Klone differenzieren nicht zu Photorezeptorzellen.	62
Abbildung 58: Das retinale Determinierungsgen Dac ist nicht in Fuss-Klonen exprimiert.	62
Abbildung 59: Überexpression von Fuss verhindert die Expression von Dpp.	63
Abbildung 60: Fuss-Klone zeigen eine verstärkte Proliferation.	64

Abbildung 61: Fuss-Klone exprimieren Wg.....	65
Abbildung 62: toy^{hdl} -Mutation führt zu deformierten Pilzkörpern.....	72
Abbildung 63: Knockdown von Fuss in allen Neuronen führt ebenfalls zu einem Siestaphänotyp.	116
Abbildung 64: Ein Fuss-Neuron je Thorakalheminuromer zeigt Gooseberry-Expression.....	117
Abbildung 65: Engrailed und Fuss kolokalisieren nicht im VNS.	117
Abbildung 66: Fuss bindet an den spa-Genlokus.	117

6.8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung verwendeter Fliegenstämme	82
Tabelle 2: Auflistung verwendeter Bakterienstämme und Zellkulturen.....	83
Tabelle 3: Auflistung verwendeter Medien	83
Tabelle 4: Auflistung verwendeter Vektoren	84
Tabelle 5: Auflistung verwendeter Oligonukleotide.....	85
Tabelle 6: Auflistung verwendeter Lösungen.....	87
Tabelle 7: Verwendete Antikörper, deren Antigene, Verdünnung und Herkunft .	89
Tabelle 8: Auflistung kommerziell erhältlicher und verwendeter Kits	89
Tabelle 9: Auflistung verwendeter Geräte	90
Tabelle 10: Auflistung verwendeter Software.....	91
Tabelle 11: Schritte der Reinigung über Metallchelataffinitätschromatographie .	94
Tabelle 12: Immunisierungsschema	95
Tabelle 13: qPCR Mastermix	96
Tabelle 14: two step qPCR Programm	97
Tabelle 15: Ligationsansatz.....	99

6.9 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar
BrdU	Bromdesoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa

cDNA	complimentary DNA
cm	Zentimeter
CT	<i>cycling threshold</i>
CV	Säulenvolumen
d	Tage
DamID	<i>DNA adenine methyltransferase identification</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GW	Gateway
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
IF	Immunfluoreszenz
kb	Kilobasen
l	Liter
LacZ	β-Galactosidase
M	molar
min	Minute
ml	Milliliter
mM	milimolar
ng	Nanogramm
OBP	Odyssey Blocking Puffer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PBST	<i>phosphate buffer saline</i> mit Triton
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
SDBB	<i>semi dry blotting buffer</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sec	Sekunde
TaDa	<i>Targeted DamID</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	<i>Tris buffered saline</i> mit Tween
tm	<i>trademark</i>
U	Umdrehungen

UTR	<i>untranslated region</i>
v	Geschwindigkeit
V	Volt
WB	<i>Western Blot</i>

Vielen Dank...

An meinen Doktorvater Prof. Dr. Stephan Schneuwly

An meine Mentoren Prof. Dr. Frank Sprenger und Prof. Dr. Thomas Raabe

An Dr. Florian Bayersdorfer und Dr. Susanne Fischer und allen Mitarbeitern des Lehrstuhls insbesondere Eva Harant, Oliver Edenharter, Dr. Juan A. Navarro, Dr. José Botella, Renate Reng, Ursula Roth und Eva Köppel.

An Prof. Dr. Charlotte Förster und Dr. Matthias Schlichting

An Dr. Christof Rickert

An Dr. Florian Busch

An meine Studenten

An meine Frau Bianca und meine Töchter Ida und Helene

An meine Eltern und Freunde

Eidesstattliche Erklärung

(1) Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

(2) Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise entgeltlich/unentgeltlich geholfen:

1.

2.

3.

(3) Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

(4) Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den

Mathias Raß